

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Ondřej Mitrovský

ANALÝZA VŮNÍ KVĚTŮ *CLUSIA BLATTOPHILA*

Analysis of flower scents *Clusia blattophila*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Blanka Kalinová, CSc.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Praha 2013

Tato diplomová práce byla vypracována v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. v Praze a vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru: Důsledky opylování šváby na reprodukční úspěch rostlin – GA ČR P505/12/P039 a z prostředků grantu AV ČR – Z4-055-905.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. v Praze je možné pouze po písemném souhlasu obou těchto institucí.

V Praze dne 28. srpna 2013

ABSTRAKT

Jihoamerická rostlina *Clusia blattophila*, rostoucí na stolových horách Francouzské Guayany, produkuje poměrně značné množství těkavých látek ve vůni svých květů. *C. blattophila* je dvoudomá rostlina s rozdílnou dobou kvetení jednopohlavních květů. Samčí květy rozkvétají na jedinou noc, samičí květou dvě noci. Cílem mé diplomové práce bylo analyzovat odebrané vzorky těkavých látek vylučovaných samčími i samičími květy a porovnat jejich kvalitativní a kvantitativní charakteristiky. Proto byly v průběhu kvetení těkavé látky zachytávány na adsorbent, poté vymývány hexanem a semikvantitativně analyzovány za pomoci vnitřního standardu. Analýza získaných vzorků byla provedena dvoudimenzionální plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. U jednotlivých pohlaví byly z naměřených dat stanoveny kvantitativní a kvalitativní charakteristiky složení vůní. Také byl zkoumán trend produkce hlavní těkavé složky, acetoinu, u samčích a samičích květů během první noci kvetení.

Květní vůně jsou složité směsi. Celkem bylo identifikováno 43 různých chemických látek. Mezi nimi se vyskytují v různých intenzitách monoterpeny (α -pinen, kamfen, β -pinen, myrcen, limonen, (*E*)- β -ocimen, kafr), seskviterpeny (α -kopaen, β -karyofylen, *cis*- α -bergamoten, *trans*- α -bergamoten, aromadendren, (*E,E*)- α -farnesen, δ -kadinen), aldehydy (pentan-1-al, hexan-1-al, oktan-1-al, *n*-dekanal), ketony (acetoin a jeho dimer, hexan-2,5-dion, 6-methylhept-5-en-2-on), alkohol butan-2,3-diol, karboxylová kyselina 2-methylpropanová, alifatické uhlovodíky (heptan, hepta-1,5-dien, undekan, (4*E*)-dodecen, (3*Z*)-dodecen, tridekan, tetradekan), aromatický uhlovodík *p*-acetyltoluen a nitrosloučenina 1-nitro-3-methylbutan. 10 látek nebylo identifikováno. Složení vůní samčích a samičích vůní je kvalitativně i kvantitativně odlišné. Květní vůně obou pohlaví sdílí některé těkavé látky, ale každé pohlaví je charakterizováno přítomností sex-specifických látek. Pro samičí květy je typický vyšší výskyt monoterpenů přes den, kdežto např. UK 1,2 a butan-2,3-diol a seskviterpeny se vyskytují převážně u samčích květů. Výsledky mapování produkce hlavní těkavé složky, acetoinu, u samčích a samičích květů jsou pouze orientační. Naznačují, že obě pohlaví produkují acetoin v nejvyšší míře v období bezprostředně po soumraku, tj. mezi 18. a 22 hodinou.

ABSTRACT

South American plant *Clusia blattophila*, growing on Nouraghes of French Guiana, produces relatively large amounts of volatile substances in the fragrance of its flowers. *C. blattophila* is dioecious plant with different flowering time of monosex flowers. Male flowers bloom for one night, while female flowers bloom two nights. The volatiles were adsorbed to the adsorbent and washed out with hexane with internal standard. Analysis was performed by two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection. The aim of my thesis was to determine the qualitative and quantitative characteristics of flower scents of both sexes. I also studied, whether there are differences in production of the major fragrance component, acetoin, during the first night of blooming.

The flower fragrance is complex blend of volatiles. In total, 43 different chemicals were identified. Among them were monoterpenes (α -pinene, camphene, β -pinene, myrcene, limonene, (E)- β -ocimene, camphor) sesquiterpenes (α -copaene, β -caryophyllene, cis- α -bergamotene, trans- α -bergamotene, aromadendrene, (E,E)- α -farnesene, δ -cadinene), aldehydes (1-pentanal, 1-hexanal, 1-octanal, *n*-decanal), also four ketones (acetoin and its dimer, 2,5-hexanedione, 6-methylhept-5-en-2-one), alcohol butane-2,3-diol, carboxylic acid 2-methylpropanoic, aliphatic hydrocarbons (heptane, 1,5-heptadiene, undecane, (4E)-dodecene, (3Z)-dodecene, tridecane, tetradecane), aromatic hydrocarbon *p*-acetyltoluene and nitrocompound 1-nitro-3-methylbutane. 10 compounds remained unidentified. The composition of male and female fragrance differs qualitatively and quantitatively. The volatile blends of both sexes share some compounds but are also characterized by sex-specific volatiles. Female specific compounds were identified as monoterpenes during the day, whereas compounds like UK 1,2 and 2,3-butanediol only and sesquiterpenes were found mostly in males. Data suggest that maximum production of acetoin in flower fragrance of both sexes occurs after dusk, between 6 – 10 p.m.

KLÍČOVÁ SLOVA

Clusia blattophila, dvoudimenzionální plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, těkavé látky, vůně květů, opylování.

KEYWORDS

Clusia blattophila, two-dimensional gas chromatography, mass spectrometry, volatile substances, flower scents, pollination.

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svému konzultantovi RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za to, že mi umožnil vypracovat diplomovou práci na oddělení infochemikálií Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., své školitelce RNDr. Blance Kalinové, CSc. za vedení mé diplomové práce a užitečné rady při její tvorbě. Za metodické rady při analýze bych rád poděkoval Ing. Michalu Hoskovcovi, CSc. a Ing. Radce Břízové. Poděkování patří také mé rodině za finanční podporu po celou dobu studia na vysoké škole.

OBSAH

| | |
|--|---------------|
| SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ | - 8 - |
| 1 ÚVOD | - 9 - |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST | - 10 - |
| 2.1 Chemická komunikace | - 10 - |
| 2.1.1 Těkavé látky a obrana rostlin | - 11 - |
| 2.1.2 Těkavé látky a rozmnožování rostlin | - 11 - |
| 2.2 <i>Clusia blattophila</i> sp. nov. | - 12 - |
| 2.2.1 Botanický popis <i>Clusia blattophila</i> sp. nov. | - 12 - |
| 2.2.2 Opylovači <i>C. blattophila</i> | - 14 - |
| 2.3 Metodika studia přírodních látek | - 14 - |
| 2.3.1 Metody izolace vzorků semiochemikálií | - 15 - |
| 2.3.1.1 Extrakce | - 15 - |
| 2.3.1.2 Destilace vodní parou | - 15 - |
| 2.3.1.3 Mikroextrakce na pevné fázi (SPME) | - 16 - |
| 2.3.1.4 Headspace techniky | - 17 - |
| 2.3.2 Metody analýzy vzorků semiochemikálií | - 18 - |
| 2.3.2.1 Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí | - 19 - |
| 2.3.2.2 Ionizační techniky hmotnostní detekce | - 19 - |
| 2.3.2.3 Analyzátory v hmotnostní detekci | - 20 - |
| 2.3.2.4 Dvourozměrná plynová chromatografie | - 22 - |
| 2.3.2.5 Plynová chromatografie ve spojení s infračerveným detektorem | - 23 - |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | - 24 - |
| 3.1 Chemikálie | - 24 - |
| 3.2 Přístroje | - 24 - |
| 3.3 Pracovní postupy | - 24 - |
| 3.3.1 Odběr vzorků | - 24 - |
| 3.3.2 Analýza vzorků metodou GC×GC-MS | - 25 - |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUSE | - 27 - |
| 5 ZÁVĚR | - 51 - |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | - 52 - |

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

sp. nov. – nový druh

C. – *Clusia*

SPME – mikroextrakce na pevné fázi

HS – metoda headspace

FID – plamenově ionizační detektor

GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

EAD – elektroantenografická detekce

TSI – ionizace termosprejem

ESI – ionizace elektrosprejem

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

MALDI – laserová desorpce/ionizace za účasti matrice

GC×GC/MS-TOF – dvourozměrná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a
průletovým analyzátozem

SIMS – hmotnostní spektroskopie sekundárních iontů

SNMS – hmotnostní spektroskopie sekundárních neutrálních částic

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

FTNMR – nukleární magnetická rezonance s Fourierovou transformací

RI – retenční index

$t_{R,1}$ – retenční čas v první dimenzi

$t_{R,2}$ – retenční čas ve druhé dimenzi

UK – neidentifikovaná látka

1 ÚVOD

Clusia blattophila sp. nov. je nově popsaným dvoudomým druhem keře endemicky se vyskytujícím pouze na několika stolových horách v oblasti Nouragues Inselberg na východě území Francouzské Guayany v Jižní Americe. Jedná se o dominantní křovinnou vegetaci masivních žulových skal kořenící ve skalních prohlubních naplněných zeminou.

Květy se objevují od července do listopadu a jsou uspořádány v květenstvích skládajících se ze 2 až 16 drobných světle žlutých kvítků. Prozatímni výzkum ukazuje, že mezi časté návštěvníky těchto květů patří mravenci, blíže neurčený dvoukřídlý hmyz, švábi *Epilampra sodalis* a *Amazonina platystylata* z rodu *Blattodea* a další členovci. Zda a do jaké míry se tyto druhy hmyzu podílejí na opylování *C. blattophila* není doposud objasněno.

Samičí rostliny kvetou celkem dvě noci a den mezi nimi, květy samčí odkvétají již ráno po první noci kvetení. Květy obou pohlaví vylučují specifickou vůni, která by mohla lákat případné opylovače. První výzkumy ukázaly, že majoritní složkou vůně samčích květů je acetoin - látka vyskytující se v sexuální feromonu některých druhů švábů. Zda rostlina používá specializovanou strategii k přilákání svých hlavních opylovačů je v současnosti předmětem výzkumu. Cílem diplomové práce bylo analyzovat vzorky těkavých látek obou pohlaví květů *C. blattophila* odebrané ve Francouzské Guayaně v srpnu 2012, potvrdit přítomnost acetoinu ve vzorcích vůní květů samčích a samičích rostlin a zjistit, jaké další látky jsou ve vůni přítomny a v jakém množství jsou zastoupeny. Dále jsem zkoumal, jak se mění množství acetoinu produkovaného květy obou pohlaví během první noci kvetení a zda existují rozdíly v jeho produkci mezi samčími a samičími květy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chemická komunikace

Komunikace je proces přenosu signálu mezi organismy, ať už se jedná o živočichy nebo rostliny. V případě např. hmyzu ji lze rozdělit podle smyslů, které ji zprostředkovávají na – zrakovou, zvukovou, hmatovou a chemickou. U rostlin jsou možnosti komunikace značně omezeny. Vedle vizuálních signálů rostliny komunikují především pomocí nejrůznějších chemických látek [1]. Chemické látky, které zprostředkují výměnu informace mezi organismy, pak bez ohledu na jejich původce a informační obsah nazýváme semiochemikáliemi [2]. Lze je obecně rozčlenit do dvou kategorií – na látky pro vnitrodruhovou komunikaci – nazývající se feromony – a na látky sloužící pro mezidruhovou komunikaci – allelochemikálie. Allelochemikálie lze dále rozdělit podle toho, zda má z chemického signálu jimi zprostředkovaného prospěch organismus signál vysílající nebo přijímající. Tři základní kategorie allelochemikálií jsou allomony, kairomony a synomony. Allomony jsou látky, z jejichž vysílání má prospěch vysílající organismus. Tyto látky nejčastěji slouží k ochraně proti predátorům, často u rostlin. Kairomony slouží ke komunikaci mezi druhy, kdy má prospěch z komunikace příjemce chemického signálu [3]. Synomony jsou látky prospěšné pro oba takto interagující organismy [1].

Rostliny jakožto nepohyblivé organismy interagují s okolím převážně chemicky. Produkují velké množství sekundárních metabolitů, které je mají chránit či zvyšovat šance na přežití a rozmnožení. Sekundární metabolity jsou organické látky vznikající v těle rostlin, které nejsou přímo zahrnuté do procesu růstu, vývoje či rozmnožování. Těkavé látky přitom tvoří pouze asi 1% sekundárních metabolitů rostlin. V roce 2006 bylo popsáno více než 1700 těkavých látek rostlinného původu z devadesáti rostlinných čeledí [4]. Z chemického hlediska se jedná převážně o terpeny, mastné kyseliny, deriváty aminokyselin a nejrůznější aromáty [5]. Těkavé látky jsou obvykle lipofilní kapaliny s dostatečně vysokou tenzí par, jež mohou snadno volně procházet přes buněčné membrány. Rostliny je vypouštějí do atmosféry nebo půdy. Chemické složení emitovaných směsí může také poskytovat informace o fyziologickém stavu rostliny, případně míře stresu, kterému byla vystavena [6].

2.1.1 Těkavé látky a obrana rostlin

Primární funkcí vylučovaných těkavých látek je obrana rostliny proti býložravcům a patogenům [7,8]. Sekundárně jsou těkavé látky využívány pro komunikační účely. Tak jsou vůněmi lákáni opylovači, fytofágní hmyz využívá těkavé látky při vyhledávání hostitelské rostliny. Bylo zjištěno, že napadení rostliny mění složení těkavých látek. V důsledku žíru, který indukuje expresi obranných genů, se zvyšuje produkce obranných látek působících nejen proti škůdci samotnému, ale láká i jeho specifické predátory. Těkavými látkami se ovšem mohou rostliny dorozumívat i mezi sebou a například preventivně varovat okolní rostliny před případným nebezpečím. I tento signál mezi rostlinou napadenou a rostlinou rostoucí v okolí indukuje expresi obranných genů a v důsledku zvyšuje produkci obranných látek. Tím je rostlina lépe připravena na budoucí pravděpodobný útok. Těkavé látky, které ovlivňují obranyschopnost okolních rostlin mohou být přenášeny vzduchem nebo uvolňovány z kořenů do půdy [9].

2.1.2 Těkavé látky a rozmnožování rostlin

Často také produkce a následné uvolňování látek do okolního prostředí poskytuje reprodukční výhodu ve smyslu vábení opylovačů a živočichů šířících semena [7,8]. Ta je vzhledem k značnému selekčnímu tlaku v přírodě velmi důležitá, neboť organismy potřebují dosáhnout co nejvyšší možné reprodukční účinnosti. V roce 2000 bylo známo asi čtvrt milionu druhů kvetoucích rostlin, z nichž většina je opylována za pomoci zvířat. Vůně květu je signál, díky kterému mohou opylovači nalézt určitou květinu, jejíž nektar a pyl jim případně poslouží jako potrava. Hmyz může takto nalézt konkrétní druh rostlin, nebo dokonce určitý květ v rámci jedné rostliny. Květinové vůně mohou obsahovat mezi jednou a jedním stem těkavých látek, nejčastěji to však bývá mezi dvaceti a šedesáti látkami. Celkové množství emitovaných látek se může pohybovat od jednoho pg až po 30 i více μg za hodinu. Nejvyšší produkci těkavých látek se vyznačují rostliny, které mají za své opylovače různé druhy nočních brouků a můr. Květiny opylované můrami často intenzivněji voní právě v době aktivity svých opylovačů. I velmi blízce příbuzné druhy rostlin mohou vytvářet vůně s různým chemickým složením. Důvodem jsou specializované vztahy různými druhy opylovačů, přičemž každý opylovač má své čichové preference. Důležitá je i zkušenost opylovače

se specifickou vůní, která poté může lákat k opakovanému využití konkrétního druhu rostliny jako zdroje potravy. Rostliny neuvolňují neustále stejné vůně, poměry jednotlivých komponent se mohou měnit v závislosti na vnitřních denních rytmech a stádiu květu i květiny. Dále svou roli hrají i faktory vnějšího prostředí, jako jsou světlo, teplota a vlhkost. U většiny druhů není známo, zda hmyzí opylovači používají k identifikaci květu jen některé ze složité směsi látek nebo jestli rozpoznávají vůni jako celek [9].

Za pomoci genového inženýrství, umlčování genů a jejich selektivní exprese, je možné zkoumat tyto vzájemné interakce mezi rostlinami a hmyzem [9]. Získané poznatky mohou být využity pro vývoj lepších agronomických vlastností plodin, jako jsou odolnosti vůči škůdcům a nemocím, proti plevelům, zlepšení vůně okrasných rostlin, opylování semenných plodin a sekundárně pak i pro výrobu léčiv rostlinami.

2.2 *Clusia blattophila* sp. nov.

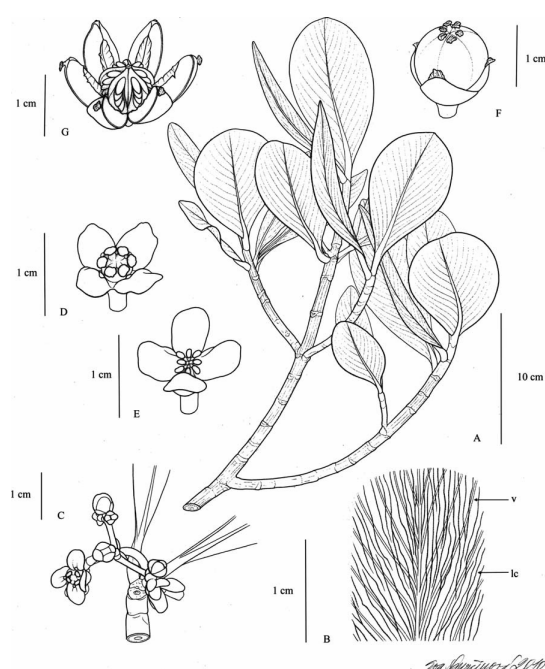
2.2.1 Botanický popis *Clusia blattophila* sp. nov.

Neotropický rod *Clusia* je se svými více než 300 druhy stromů a keřů jedním z největších rodů čeledi klusiovité (*Clusiaceae*), rostlin z řádu malpighiotvaré (*Malpighiales*) [10]. Velké množství rostlin rodu *Clusia* (odhaduje se nejméně 50) zůstává zatím vědecky nepopsáno.

Clusia blattophila sp. nov. (*Clusiaceae*, dále již jen *C. blattophila*) byla v roce 2011 popsána jako nový druh [10]. Od svých blízkých příbuzných se liší především velikostí a počtem okvětních lístků a tyčinek. Unikátní je její téměř přisedlé květenství a sekreční jamka na vrcholu samčích květů, produkující viskózní kapalinu. Druh je znám pouze z oblasti Nouragues Inselberg ve východní Francouzské Guayaně v Jižní Americe, kde roste na masivních žulových skalách v dutinách naplněných zeminou.

Jedná se o pozemní nebo epilitický (na skále rostoucí) dvoudomý keř nebo malý stromek. Jeho kůra je hladká, stříbřitě šedá [10]. Při poranění produkuje bílý latex, na vzduchu rychle oxidující. Po oxidaci se mění barva latexu na žlutou. Květenství se skládá ze 2 až 16 drobných (8 –12 mm) kvítků světle žluté barvy. Květy se objevují v období od poloviny července do začátku listopadu, tedy v období sucha. Samčí květy rozkvétají na jedinou noc, samičí kvetou dvě noci a i přes den mezi nimi. Mezi hlavní

návštěvníky květů patří švábi rodu *Blattodea*, podle nichž získala rostlina své druhové jméno. Švábi jsou odměňováni potravou v podobě kapaliny neznámého složení, kterou produkuje sekreční jamka na vrcholu samčích květů. Plody jsou žluté až zelené, kulovité, 11 – 17 mm velké. Dozrávají po sedmi měsících. Semena jsou 4 × 2 mm velká, oválná, světle oranžové barvy. Jsou roznášena po okolí malými ptáky, kteří se plody živí. Strom často tvoří boční horizontální větve s přídatnými kořeny, směřujícími dolů. To umožňuje rostlině růst plazivě po skalách, což zároveň způsobilo její majoritní výskyt v oblasti Nouragues Inselberg a menších skalnatých výběžcích v blízkém okolí.



Obr. 2.1 - Nákres *C. blattophila* [9]

(A) vzhled, (B) abaxiální řez listem, žilnatina (v) a latexové kanály (lc), (C) samičí květenství, (D) květ s pestíky (♀), (E) květ s tyčinkami (♂), (F) plod, (G) otevřený plod.

Mikroklima této oblasti je podstatně odlišné od okolního, typicky nížinného, deštného pralesa [10]. Teploty v průběhu 24 hodin kolísají mezi 18 a 55 °C, přičemž vlhkost vzduchu se pohybuje mezi 20 a 100 %.

2.2.2 Opylovači *C. blattophila*

Doposud nepublikované výsledky ukazují, že mezi opylovači *C. blattophila* jsou vedle švábů *Amazonina platystylata* z rodu *Blattodea* také mravenci, dvoukřídlý hmyz (zatím přesněji neurčený), cvrčci, švábi *Epilampra sodalis* (vzácně se vyskytující herbivor) a pavouci.

Švábi jsou poměrně málo častí opylovači. První zmínka o opylování květů šváby je z roku 1997, konkrétně u rostliny *Uvaria elmeri* z čeledi láhevnikovité (*Annonaceae*). Jedná se o popínavou rostlinu tropického deštného pralesa v Malajsii. Švábi patřící do čeledi *Blattellidae* a rodu *Hemithysocera* jsou jejími hlavními, i když ne jedinými opylovači [11]. Vůně květů připomíná pach rozkládajícího se dřeva nebo hub. Švábi se živí pylem a sekretem z květů, přičemž v noci navštěvují květy obou pohlaví a přes den pouze květy samičí [12]. Šváb *A. platystylata* často navštěvující květy *Clusia* aff. *sellowiana* z čeledi klusiovité (*Clusiaceae*) je dalším nedávno objeveným opylovačem [13].

Při předcházejících analýzách vůní květů *C. blattophila* bylo zjištěno, že hlavní komponentou květů je acetoin, látka, která se vyskytuje ve feromonu u malajsijského druhu roháče (*Scapanes australis*)), kůrovce *Dendroctonus simplex*, americké plošnice *Phytocoris brevisculus* a několika druhů chrostíků (*Monocosmoecus pulcherrimus*, *Limnephilus politus*, *Limnephilus nigriceps*, *Anabolia laevis*). Acetoin je součástí sexuálního feromonu u švábů *Leucophaea maderae*, *Nauphoeta cinerea*, *Henschoutedenia flexivitta*. U dalších druhů hmyzu acetoin může působit jako allomon či kairomon [14]. Zda je acetoin součástí feromonu u *Amazonina platystylata*, zatím zjištěno nebylo.

2.3 Metodika studia přírodních látek

Studium přírodních látek je velmi specifický obor, kde se lze často setkat se vzorky s velmi malým obsahem některých složek. Nezřídka je třeba zjistit přítomnost nebo dokonce konkrétní množství analytu ve vzorku v řádech nano či pikogramů. Dalším problémem může být složitost vzorků, častá je i nemožnost jejich odběru bez znečištění nežádoucími příměsmi. Toto lze považovat za základní úskalí a specifika práce

s přírodními látkami. V souladu s tím je nutné vždy zvolit nejvhodnější možné a dostupné metody analýzy a izolace.

2.3.1 Metody izolace vzorků semiochemikálií

Aby bylo možno provést chemickou analýzu, je třeba nejprve získat vzorek. K tomu je velmi důležité zvolit vhodnou izolační techniku. Každá z dostupných metod má pochopitelně svoje výhody a nevýhody a každá je vhodná pro jiné typy a koncentrace vzorků.

2.3.1.1 Extrakce

Nejjednodušší metodou izolace přírodních látek je extrakce rozpouštědlem. Výsledek extrakce je ovlivněn několika faktory, mezi nejdůležitější patří volba rozpouštědla a teplota, při které děj probíhá. Pro získání co možná nejkoncentrovanějšího vzorku je nutné zvolit co nejmenší objem rozpouštědla [2]. Je vhodné provést několik opakování, např. tři, čímž je následně dosaženo vyšší účinnosti extrakce [15]. Zároveň by mělo zvolené rozpouštědlo extrahovat maximální množství aktivních látek a co nejméně látek balastních, tento požadavek je často obtížně splnitelný, a tak dochází k výskytu velkého množství nežádoucích látek v extraktu. I díky tomu bývá tato izolační technika v mnoha případech nevhodná, nebo je nutné provést následnou frakcionaci vzorku [2].

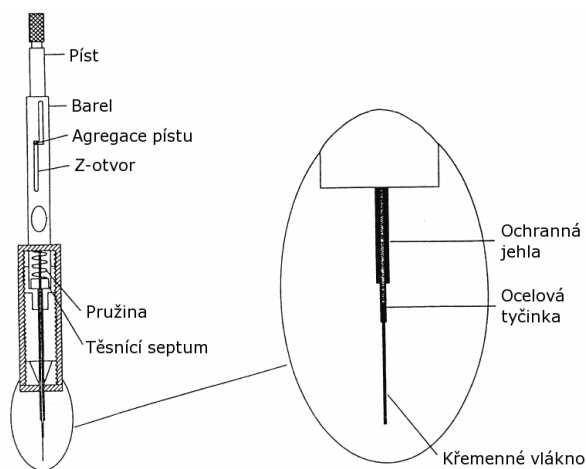
2.3.1.2 Destilace vodní parou

V minulosti se jednalo o nejvíce používanou techniku pro izolaci vzorků ve formě esenciálních olejů z rostlin, která umožňovala získání větších množství látek [2]. Princip metody spočívá v tom, že vodní pára přiváděná do baňky o větším objemu působí na větší množství sušených nebo čerstvých rostlinných materiálů po dobu jedné až několika hodin. Tímto postupem vznikne kondenzát – voda a olej – který je opakovaně extrahován rozpouštědlem, např. diethyletherem. Pro odstranění zbylé vlhkosti lze použít např. síran sodný, který je poté odstraněn filtrací. Rozpouštědlo je následně odpařeno a vznikne tak koncentrovaný esenciální olej [15]. Nevýhodou je spotřeba velkého množství rozpouštědel a výchozího materiálu a nebezpečí možných

chemických transformací některých původních komponent. Vzhledem k citlivějším analytickým metodám dnes již nejsou zapotřebí tak velká množství vzorku. Navíc vzhledem k možnosti degradace citlivějších látek jsou dnes voleny spíše šetrnější izolační techniky [2].

2.3.1.3 Mikroextrakce na pevné fázi (SPME)

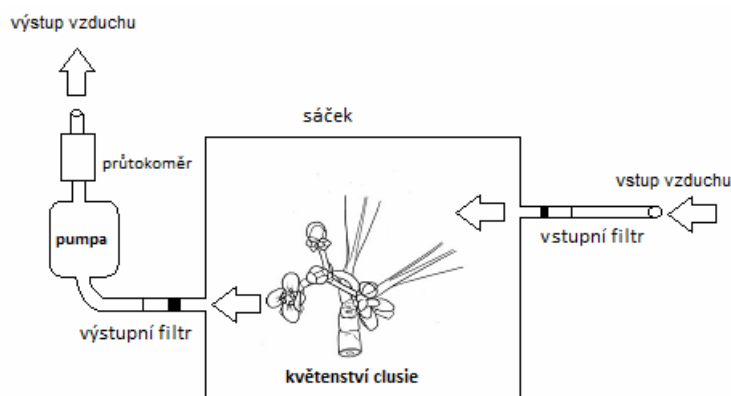
Metoda zdokonalující extrakci na pevné fázi (SPE). SPME slučuje vzorkování, extrakci, zakoncentrování a zavádění vzorku do jednoho kroku, což je bezesporu její největší výhodou. Celá analýza navíc probíhá zcela bez použití rozpouštědel. Analyty se koncentrují na extrakčním vlákně. Často je SPME používána v kombinaci s plynovou chromatografií, většinou s hmotnostní detekcí. Užitečná je při analýze těkavých, či alespoň částečně těkavých organických sloučenin. U slabě těkavých nebo tepelně nestálých sloučenin je možné použít modifikaci ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií opět s hmotnostní detekcí [16]. V současnosti se také využívá spojení s kapilární elektroforézou. Touto metodou lze provádět i farmaceutické, toxikologické a forenzní analýzy, jako je analýza vlasů, krevní plazmy, moči a dalších vzorků [17]. SPME je adsorpčně/desorpční technika, jejímž hlavním nástrojem je křemenné vlákno pokryté různými typy stacionární fáze lišících se polaritou i svými sorpčními vlastnostmi [18]. Na obr. 2.2 lze vidět detailní schéma zařízení pro SPME. V prostoru, kde se těkavé sloučeniny jímají, je extrakční vlákno vysunuto z jehly, která ho chrání, a poté dochází k adsorpci látek. Ty pak před započítím analýzy za zvýšené teploty desorbují [2].



Obr. 2.2 - Schéma zařízení pro SPME [17]

2.3.1.4 Headspace techniky

Tyto techniky jsou vhodné pro těkavé látky mající dostatečnou tenzi par při běžných laboratorních teplotách, aby mohly být přenášeny proudem vzduchu [2]. Těkavost látek lze zvyšovat zahříváním uzavřené nádoby se vzorkem. Je potřeba ovšem znát teplotu, při které jsou látky maximálně těkavé, ale ještě nedochází k jejich rozkladu a poškození vzorku [19]. Existují dvě základní provedení headspace aparatury [20]. Dále používané statické uspořádání spočívá v prostém nasátí atmosféry nad materiálem speciální plynotěsnou stříkačkou. Takovýto vzorek je následně přímo dávkován do plynového chromatografu [2]. Oproti tomu uspořádání dynamické je založeno na kontinuálním strhávání látek proudem okolního vzduchu a zachytávání na adsorbent. Proud vzduchu je obvykle na vstupu čištěn přes vstupní filtr. Nejobyčejnějším použitelným sorbčním materiálem je aktivní uhlí. Nevyžaduje žádné speciální zacházení, stačí ho před použitím vymýt rozpouštědlem a vysušit. Alternativou jsou specifické porézní materiály jako Super Q[®], Tenax TA, Poropak Q a Hayesep Q[®], což jsou zároveň nejčastější sorbenty používané ve filtrech pro tuto metodu [21]. Chemickým složením se v případě Hayesep Q[®] jedná o patentem chráněnou látku, na bázi polymeru divinylbenzenu [22]. Tenax je polymer 2,6-difenyl-*p*-fenylenoxidu a Poropak Q je kopolymer ethylvinylbenzen-divinylbenzen. Všechny výše uvedené polymerní adsorbenty vyžadují pro svoji plnou funkčnost aktivaci před použitím, tj. vymytí vhodnými rozpouštědly a tepelnou desorbci. Skladovány musí být v prostoru bez přístupu světla. Sorpce těkavých látek unášených proudem vzduchu v případě dynamického uspořádání headspace vzorkování vede k získání relativně koncentrovaných vzorků, protože jímání probíhá – na rozdíl od statické headspace – vždy alespoň několik hodin [2]. Jako příklad slouží níže uvedené schéma pro odběr těkavých látek *C. blattophila* – obr. 2.3. Dalším typem headspace techniky může být propojení s technikou mikroextrakce na pevné fázi (HS-SPME). Tato velmi moderní metoda umožňuje např. stanovení celé řady jednoduchých lineárních uhlovodíků u produktů ropného průmyslu ve vodných vzorcích a to zcela bez použití rozpouštědel. K analýze je zde využíváno propojení plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí (GC-FID) [23].



Obr. 2.3 - Schéma aparatury pro dynamickou headspace techniku, upravenou pro odběr vzorků z *C. blattophila*

2.3.2 Metody analýzy vzorků semiochemikálií

Semiochemikálie bývají produkovány rostlinami nebo živočichy ve velmi malém množství. Jejich identifikace je tudíž velmi často problematická. Nejčastěji používanou analytickou metodou je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Při identifikaci semiochemikálií, které ovlivňují chování hmyzu, bývá velmi často GC-MS kombinována s plynovou chromatografií spřaženou s biologickou detekcí (GC-EAD), kdy je jako detektor používáno tykadlo hmyzu citlivé ke specifickým látkám z analyzovaných vzorků (feromonů, rostlinných kairomonů, atd.). Identifikaci zvláště minoritních aktivních látek může komplikovat či úplně znemožnit přítomnost relativně vysokého množství balastního nebo neaktivního materiálu tím, že překryje odezvy látek hledaných nebo biologicky aktivních [24]. Při GC-EAD je biologický detektor často kombinován s vysoce citlivým plamenově ionizačním detektorem. Ten je schopen poskytovat lineární odezvy v širokém rozsahu koncentrací a má téměř univerzální detekční použití [20]. Možnosti hmotnostních detektorů kombinovaných s plynovou chromatografií jsou diskutovány v dalších kapitolách. Semiochemikálie nelze stanovovat také pomocí HPLC, tedy vysokoúčinné kapalinové chromatografie, neboť tato technika je vhodná pouze ke stanovení polárních netěkavých látek, zvláště proteinů a nikoliv těkavých látek. Toto platí i pro techniky HPLC-MS nebo elektroforézu [25].

2.3.2.1 Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

Plynová chromatografie je velmi hojně využívanou technikou pro analýzu a separaci těkavých komunikačních signálů, často velmi složitých chemických směsí, které jsou produkovány živými organismy. Metoda poskytuje potřebné vysoké rozlišení [26], přesto však jednodimenzionální chromatografie často nepostačuje k úplné separaci některých složitějších vzorků [27].

Pro separaci se využívá dělicích vlastností polárních i nepolárních polysiloxanových kolon (fází). Obvyklá délka kolon je mezi 25 a 30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm. Nepolární polysiloxanové fáze se často upřednostňují z důvodu pestřejšího složení využitelných sloučenin, dobré tepelné stability a dlouhé doby použitelnosti. Například pro analýzu hmyzích feromonů se nejčastěji používá 100% polydimethylsiloxanová a 5% polyfenylmethylsiloxanová fáze [28]. Jako nosný plyn se preferuje použití helia pro své chemické vlastnosti a poskytování vhodných retenčních časů eluovaných látek [26].

Pro účely analýzy vzorků včetně semiochemikálií je často využíváno spojení plynové chromatografie a hmotnostní detekce (GC-MS). Hmotnostní detektor dokáže poskytnout důležité informace o struktuře jednotlivých analytů. Jedná se o velmi citlivou metodu a její detekční limity mohou dosahovat řádově pikogramů [29].

2.3.2.2 Ionizační techniky hmotnostní detekce

Existuje celá řada ionizačních technik. Nejmodernější jsou např. techniky termospreje (TSI) a elektrospreje (ESI), při nichž je roztok analytu jemně rozprašován ve vakuu v nástřikovém prostoru GC [2], hojně používaná je elektronová a chemická ionizace ve vakuu (EI a CI) [30]. Alternativou k CI je APCI, což je chemická ionizace za atmosférického tlaku. Další možností je použití MALDI, laserová desorpce/ionizace za účasti matrice. Jedná se o šetrnou ionizační techniku umožňující analýzu a při vhodném složení aparatury také prostorovou analýzu biomolekul, různých biopolymerů jako DNA, polypeptidů, polysacharidů, triacylglycerolů a jiných poměrně křehkých organických makromolekul. MALDI vytváří málo vícenásobně nabitých iontů, což je její výhoda oproti např. ESI [31,32].

2.3.2.3 Analyzátory v hmotnostní detekci

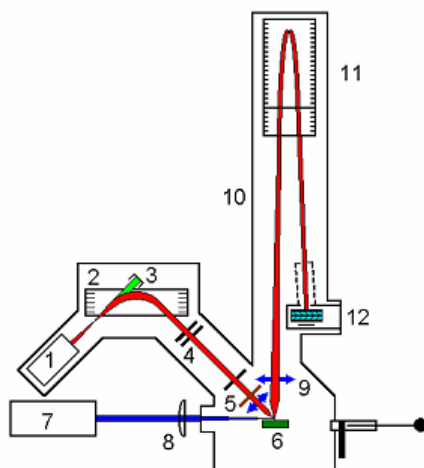
Další neméně důležitou částí hmotnostních spektrometrů jsou analyzátory iontů [2]. V kombinaci s GC popř. GC×GC metodou se používá např. iontová past, kvadrupólový analyzátor a nejčastěji průletový analyzátor (TOF viz níže).

Výhodou iontové pasti je její vysoká citlivost, ale tvar spektra je do značné míry závislý na koncentraci analytu [33]. Iontové pasti mohou být použity buď samostatně, nebo v kombinaci s jiným analyzátozem, např. TOF.

Kvadrupólový analyzátor má obecně nižší citlivost než iontová past, avšak má vysokou srovnatelnost spekter [34]. Jak napovídá název analyzátoru, skládá se ze čtyř válcových tyčí, umístěných paralelně u sebe. Ionty se rozdělují na základě stability jejich trajektorií v elektrickém poli, které vzniká aplikací napětí na tyče. Na tuto stabilitu má vliv především jejich hmotnost a poměr hmotnosti a náboje (m/z).

Průletový analyzátor (TOF) pracuje na následujícím fyzikálním principu: Je-li dána částicím o různém m/z stejná kinetická energie, budou se ty lehčí (či přesněji o menším m/z) pohybovat rychleji než částice těžší. To znamená, že jejich časy budou kratší a budou se ve spektru objevovat blíže počátku analýzy [35]. Detektory vybavené tímto analyzátozem obecně dosahují vyššího rozlišení než ty s kvadrupólem [36].

Hlavními výhodami TOF detektorů jsou extrémně krátké doby průletu všech iontů [37]. Tak je jich možné získat velké množství (až několik tisíc). Snímání spekter touto metodou vykazuje vysokou reprodukovatelnost a lepší poměr signálu k šumu než má kvadrupólový analyzátor.



Obr. 2.4 - Kombinovaný spektrometr TOF SIMS/laser-SNMS [35]

1. iontový zdroj, 2. pulzovací kondenzátor, 3. Faradayova klec, 4. shlukovací kondenzátor, 5. unipotenciální čočka, 6. vzorek, 7. excimerový laser, 8. křemenná čočka, 9. extrakční čočka, 10. volná letová dráha, 11. reflekttron, 12. detektor (kanálovací destičky).

Některé průletové analyzátory mohou být navíc vybaveny tzv. reflekttronem, což je součástka fungující jako elektrostatické zrcadlo, které výrazně zvyšuje rozlišovací schopnost analýzy [38]. Teoreticky mají takto vybavené přístroje prakticky neomezený rozsah, efektivní jsou však především pro analýzu iontů o poměru m/z do 10^6 [35].

Další možností zvýšení rozlišení je tzv. extrakce zpožděných iontů [39]. Ionty jsou extrahovány z iontového zdroje, po velmi krátké prodlevě, která pomáhá snížení počáteční distribuce kinetické energie. Tento postup se používá zejména v kombinaci s ionizací MALDI.

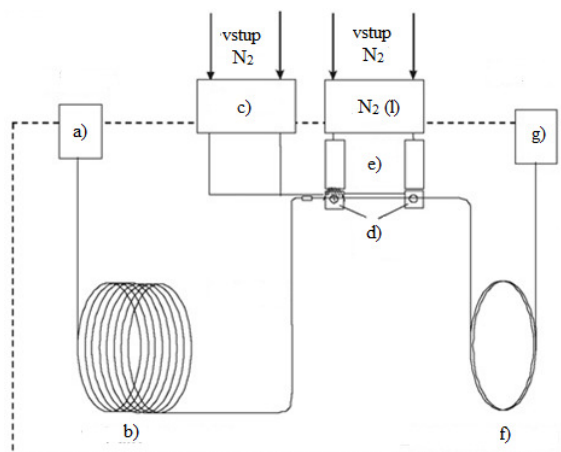
Zvýšení citlivosti detekce jednotlivých analytů lze při GC-MS analýze dosáhnout snímáním pouze vybraných fragmentačních iontů, tzv. ion selection monitoring (ISM) [2,30].

Ke všem typům hmotnostních detektorů jsou v ovládacích programech dodávány knihovny s velkým množstvím spekter, konkrétně např. knihovny NIST, které obsahují přes 60 000 naměřených spekter a porovnávají naměřené spektrum neznámé látky se spektry knihovními. Pro úplnou a jistou identifikaci je ovšem třeba srovnat nabízené spektrum se spektrem syntetického standardu analytu.

2.3.2.4 Dvourozměrná plynová chromatografie

Dvourozměrná plynová chromatografie je analytická metoda vyvinutá na počátku 90. let minulého století za účelem zlepšení separace látek ze složitých směsí [40]. Takto modifikovaná plynová chromatografie se využívá ke zvýšení účinnosti separace, což umožňuje právě analýzu složitých směsí při současné nízké spotřebě vzorku. Jedná se o dva následné separační mechanismy na dvou do série zapojených kolonách (kolony primární a sekundární) [41]. Přičemž spojení mezi primární a sekundární kolonou je zprostředkováno tzv. modulátorem, který vstřikuje eluát z první kolony do kolony druhé. Výhody dvourozměrné plynové chromatografie oproti jednorozměrné jsou nejen vyšší separační účinnost, ale také selektivita a vysoká citlivost při analýze komplexních vzorků. Nejdůležitější ovšem je schopnost rozlišit dvě látky se stejnými retenčními časy v první dimenzi, které by byly při použití klasické GC neseparovatelné [42].

První kolona bývá dlouhá desítky metrů, nejčastěji nepolárního charakteru (např. 100% methylpolysiloxan nebo 5% fenylmethylpolysiloxan), dochází na ní k separaci látek na základě těkavosti. Krátké úseky eluovaných látek z primární kolony jsou pomocí rychlého zchlazení v kryogenním modulátoru koncentrovány a po rychlém opětovném zahřátí znovu vstřikovány do kolony sekundární. Ke kondenzaci látek v modulátoru se nejčastěji používá chlazení oxidem uhličitým nebo kapalným dusíkem [43,44]. Druhá kolona, jen 1 - 2 m dlouhá, obsahuje obvykle polární stacionární fázi (např. 50% fenylpolysilfenylsiloxan) a separuje látky na základě jejich polarity. Separace na sekundární koloně trvá několik sekund. Po jejím dokončení je proveden další nástřik zakonzentrovaného eluátu (modulace). Výsledkem tohoto uspořádání (viz obr. 2.5) je komplexní separace vzorku dvěma odlišnými mechanismy ve dvou dimenzích [43,44].



Obr. 2.5 - Schéma dvourozměrného plynového chromatografu s modulátorem [27]

a) dávkovač, b) primární kolona, c) ohříváč, d) horké trysky, e) studené trysky, f) sekundární kolona, g) detektor

2.3.2.5 Plynová chromatografie ve spojení s infračerveným detektorem

Užitečné informace o struktuře semiochemikálií lze také získat spojením plynové chromatografie s detekcí infračervenou spektroskopií (GC/IR). Konkrétně se většinou jedná o metodu GC/FTIR, tedy o variantu s Fourierovou transformací. Jedná se o méně citlivou detekci (v řádech desítek nanogramů) než v případě některých hmotnostních detektorů, [25]. Tam, kde je množství semiochemikálií dostatek, je tato metoda využívána k určení geometrických a polohových izomerů [45]. Nukleární magnetická resonance (FTNMR), která je hojně využívána v analytické chemii, je pro potřeby analýzy semiochemikálií nepoužitelná, neboť klade značné nároky na množství a čistotu analyzovaného vzorku [46].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Tab. 3.1 Seznam použitých chemikálií

| název a čistota chemikálie | výrobce |
|--|---------------|
| ethanol p.a. | Penta |
| <i>n</i> -hexan p.a. | Lach-Ner |
| dodekan p.a. | Fluka |
| aceton p.a. | Penta |
| <i>n</i> -alkany (C ₈ - C ₂₂) | Sigma-Aldrich |
| dusík, helium | Messer |

3.2 Přístroje

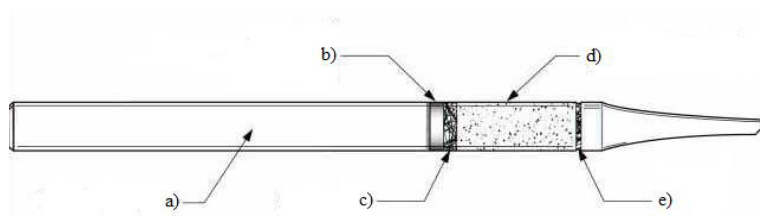
Pro odběr vzorku metodou dynamického headspace byla použita čerpadla PAS-500 Personal Air Sampler, ATH 6 mm, (California, USA). Filtry byly vypékány v horkovzdušné troubě, vybavené speciálními držáky (ASEL, HR). Pro analýzu vzorků těkavých látek byl použit dvoudimenzionální plynový chromatograf s průletovým analyzátozem a hmotnostní detekcí Pegasus 4D (LECO, USA). Chromatograf byl vybaven primární kolonou DB-5 (nepolární) o rozměrech 30 m × 250 μm i.d. × 0,25 μm (vrstva 5% fenylmethylpolysiloxanové fáze) a sekundární kolonou BPX-50 (středně polární) o rozměrech 2 m × 100 μm × 0,1 μm (vrstva 50% fenylpolysilfenylsiloxanové fáze). Mezi kolonami je modulátor skládající se ze čtyř trysek vedoucích plynný dusík, přičemž dvě jsou chlazené kapalným dusíkem a dvě vyhřívané.

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Odběr vzorků

Pro odběr vzorků byla použita metoda vychytávání těkavých látek z proudu vzduchu (tzv. dynamický headspace [47]. Nejprve byly květy obaleny pečicí fólií (Paclain), do které byly udělány 2 otvory. Do otvorů byly vloženy teflonové průchodky, do kterých byly upevňovány filtry s adsorbentem. Vzduch z prostoru obaleného květu byl nasáván vzduchovými čerpadly PAS-500 Personal Air Sampler (Spectrex) a těkavé látky byly

zachytávány na filtr s adsorbentem (skleněné trubičky naplněné 20 mg sorbentu Hayesep Q 80/100 Mesh 75 cc (CRS), viz obr. 3.1. Průtok vzduchu byl nastaven na 100 mL/min. Sáček byl kolem květu téměř vzduchotěsně uzavřen zatahovací svorkou. Tlak v obaleném prostoru s květy byl vyrovnáván vzduchem nasávaným do izolovaného prostoru přes vstupní filtr se 40 mg uvedeného adsorbentu. Látky byly vychytávány po dobu 12 hodin. Adsorbované látky pak byly vymyty 0,5 mL hexanu. Získané vzorky byly uskladněny k analýze v mrazicím boxu. Filtry byly poté znovu aktivovány promytím 5 mL destilovaného acetonu a 2 mL destilovaného hexanu a zahřátím na teplotu 140 °C a znovu použity. Náskres aparatury viz obr. 2.3. V případě měření časové variability trvalo měření pouze 4 hodiny, poté byl filtr vyměněn. V ČR byly vzorky převedeny kvantitativně do viálek a byl k nim přidán dodekan jako interní standard (na výslednou koncentraci 5 µg/mL).



Obr. 3.1 - Filtr pro záchyt těkavých látek [48]

a) borosilikátová trubička s vnějším průměrem 6,4 mm, b) teflonový kroužek, c) borosilikátová skelná vata, d) 20 mg Hayesep Q, e) sítko z nerezové oceli

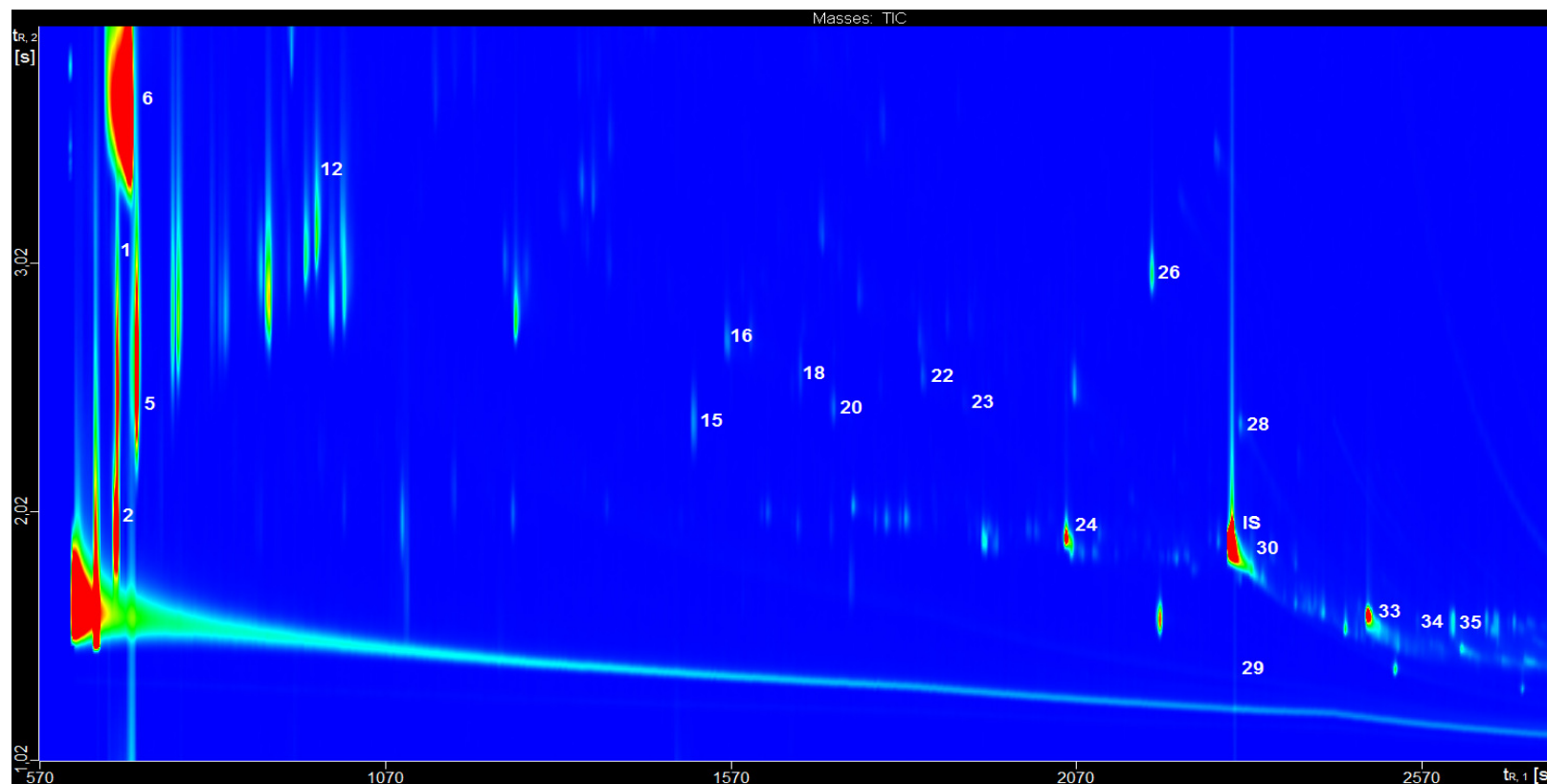
3.3.2 Analýza vzorků metodou GC×GC-MS

Pro nástřik vzorků byl použit automatický dávkovač. Dávkovaný objem byl pokaždé 1 µL. Teplota nástřiku byla 220 °C. Teplotní program primární kolony byl nastaven v rozsahu teplot od 38 do 270 °C, přičemž počáteční teplota byla udržována 10 minut a dále se zvyšovala o 3 °C/min až do dosažení 100 °C. Poté se zvyšovala o 5 °C/min až do dosažení 150 °C a pak o 15 °C/min až do maximální teploty, která byla udržována ještě 15 minut a poté analýza skončila. Teplotní program sekundární kolony začínal na 48 °C a měl stejný průběh s tím rozdílem, že ovšem při prvním zvyšování dosáhl až teploty 110 °C a dosáhl až 300 °C. Za těchto podmínek byla nejprve analyzována série alkanů C₈ - C₂₂ o koncentraci 1·10⁻³ µg/mL. Poté byly analyzovány všechny vzorky.

Analýzou byly získány dvoudimenzionální chromatogramy. Chromatogram série alkanů byl manuálně vyhodnocen (určení středů píků), čímž byly zjištěny retenční časy, které byly použity k automatickému vyhodnocení RI analyzovaných látek. Vyhodnocení vzorků bylo provedeno pomocí softwaru ChromaTOFTM. Identifikace látek je založena na srovnání knihovních spekter se spektry autentických látek a na porovnání jejich RI s publikovanými údaji. Látky, které měly nižší shodu s knihovními spektry než 900, jsou označeny jako neidentifikované. Identifikace acetoinu byla provedena také na základě shody spekter se syntetickým standardem (specifikace). Pro měření byl izolován pečící folií vždy pouze jeden květ, jen v případě samice u měření časové variability acetoinu byly obaleny květy dva a následné množství acetoinu bylo přepočítáno na jeden květ. Jako slepý vzorek byl použit vzorek získaný ze sáčkem obaleného listu z konce větve rostliny, kde chyběl květ. Množství látek ze slepých pokusů bylo odečteno od odpovídajících hodnot z naměřených vzorků.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Získané dvoudimenzionální chromatogramy vzorků byly nejprve porovnány s chromatogramy slepých pokusů (sáček, popř. sáček s listem), aby byly vyloučeny látky uvolňující se z listu a sáčku při odběru. Porovnáním naměřených hmotnostních spekter se spektry knihovními a vyloučením látek balastních bylo zjištěno, že samčí květy produkují 39 látek a květy samičí pouze 27 – 35 látek v závislosti na tom, v jakém období rozvoje květu bylo měření prováděno. Celkem bylo zjištěno 43 různých chemických látek. Deset z nich nebylo možno s jistotou identifikovat (UK1–10). Sedm z identifikovaných látek patří do skupiny monoterpenů (α -pinen **15**, kamfen **16**, β -pinen **18**, myrcen **20**, limonen **22**, (*E*)- β -ocimen **23**, kafr **26**). Dalších sedm látek náleží do skupiny seskviterpenů (α -kopaen **34**, β -karyofylen **37**, *cis*- α -bergamoten **38**, *trans*- α -bergamoten **39**, aromadendren **40**, (*E,E*)- α -farnesen **41**, δ -kadinen **42**). Dále byly identifikovány čtyři aldehydy (pentan-1-al **1**, hexan-1-al **12**, oktan-1-al **21**, *n*-dekanal **28**), také čtyři ketony (acetoin **6** a jeho dimer **29**, hexan-2,5-dion **14**, 6-methylhept-5-en-2-on **19**), jeden alkohol (butan-2,3,-diol **11**), jedna karboxylová kyselina (2-methylpropanová kyselina **43**), sedm alifatických uhlovodíků (heptan **2**, hepta-1,5-dien **5**, undekan **24**, (4*E*)-dodecen **27**, (3*Z*)-dodecen **30**, tridekan **33**, tetradekan **35**), jeden aromatický uhlovodík (*p*-acetyltoluen **32**) a jedna nitrosloučenina (1-nitro-3-methylbutan **13**). Obrázek 4.1 ukazuje některé z těchto látek přímo na dvoudimenzionálním chromatogramu, čísla vpravo od jednotlivých skvrn odpovídají číslům látek napsaným tučně za příslušnými sloučeninami. Zkratka **IS** odpovídá internímu standardu, konkrétně dodekanu.



Obr. 4.1 - Ukázka dvoudimenzionálního chromatogramu

Chromatogram ukazuje látky, které se dělí podle své hmotnosti (osa x) a podle své polarity (osa y). Barva skvrn od světle modré směrem k červené ukazuje rostoucí intenzitu a tudíž množství látek jim odpovídajících. Čísla odpovídají látkám, kterým byla přiřazena v tabulkách 4.1a a 4.1b. Ne všechny látky jsou v chromatogramu očíslovány. Neočíslované látky se vyskytovaly v kontrolních vzorcích. Chromatogram představuje ukázkou konkrétního vzorku samčího květu.

Identifikované těkavé látky, tj. systematické i triviální názvy včetně jejich retenčního chování (retenční časy v první $t_{R, 1}$ [s] a druhé dimenzi $t_{R, 2}$ [s], retenční indexy RI) byly pro svůj poměrně velký počet (43) shrnuty v tabulkách 4.1a a 4.1b, uvedených níže. Látky, které neměly součet ploch píků alespoň 200 000 (což odpovídá asi 5 ng), nebyly dále zpracovávány a do tabulek zaneseny nebyly. Látky byly seřazeny vzestupně dle svých retenčních indexů. Pro výpočet retenčních indexů byly spolu s květními vzorky analyzovány i série standardů *n*-alkanů. Jelikož byl při měření použit program s teplotním gradientem, mluvíme o retenčních a nikoli Kovatsových indexech a to z důvodu, že retenční indexy jsou na méně polárních fázích na teplotě téměř nezávislé. Vztah pro výpočet je totiž následující:

$$RI = n \cdot 100 + 100 (\log t'_{R,vz} - \log t'_{R,n}) / (\log t'_{R,n+1} - \log t'_{R,n})$$

n je počet atomů uhlíku v nejbližším nižším *n*-alkanu, $t'_{R,vz}$ je redukovaný retenční čas píku analytu, $t'_{R,n}$ je redukovaný retenční čas nejbližšího nižšího *n*-alkanu, $t'_{R,n+1}$ je redukovaný retenční čas nejbližšího vyššího *n*-alkanu [49].

Tab. 4.1a Retenční chování těkavých látek identifikovaných v květech *C. blattophila* metodou GC×GC (1/2)

| Č. | Systematický název | Triviální název | RI | t _{R, 1} [s] | t _{R, 2} [s] |
|----|---|-----------------|------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | pentan-1-al | - | 699 | 674 | 3,09 |
| 2 | heptan | - | 699 | 678 | 1,92 |
| 3 | UK1 | - | 702 | 686 | 3,72 |
| 4 | UK2 | - | 704 | 690 | 3,64 |
| 5 | hepta-1,5-dien | - | 704 | 694 | 2,21 |
| 6 | 3-hydroxybutan-2-on | acetoin | 710 | 710 | 3,86 |
| 7 | UK3 | - | 750 | 842 | 2,83 |
| 8 | UK4 | - | 767 | 898 | 2,93 |
| 9 | UK5 | - | 768 | 902 | 2,89 |
| 10 | UK6 | - | 770 | 910 | 3,05 |
| 11 | butan-2,3-diol | - | 777 | 934 | 0,02 |
| 12 | hexan-1-al | - | 800 | 1006 | 3,60 |
| 13 | 1-nitro-3-methylbutan | - | 902 | 1394 | 3,53 |
| 14 | hexan-2,5-dion | - | 928 | 1490 | 0,67 |
| 15 | 2,6,6-trimethylbicyklo[3.1.1]hept-2-en | α-pinen | 936 | 1514 | 2,39 |
| 16 | 2,2-dimethyl-3-methylenbicyklo[2.2.1]heptan | kamfen | 951 | 1570 | 2,53 |
| 17 | UK7 | - | 957 | 1594 | 0,68 |
| 18 | 6,6-dimethyl-2-methylenbicyklo[3.1.1]heptan | β-pinen | 978 | 1666 | 2,59 |
| 19 | 6-methylhept-5-en-2-on | - | 987 | 1698 | 3,15 |
| 20 | 7-methyl-3-methylenokta-1,6-dien | myrcen | 992 | 1714 | 2,45 |
| 21 | oktan-1-al | - | 1005 | 1758 | 2,88 |
| 22 | 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cyklohexen | limonen | 1033 | 1846 | 2,57 |

Tab. 4.1b Retenční chování těkavých látek identifikovaných v květech *C. blattophila* metodou GC×GC (2/2)

| Č. | Systematický název | Triviální název | RI | t _{R,1} [s] | t _{R,2} [s] |
|----|--|----------------------------|-----------|----------------------|----------------------|
| 23 | (3 <i>E</i>)-3,7-dimethylokta-1,3,6-trien | (<i>E</i>)-β-ocimen | 1053 | 1906 | 2,46 |
| 24 | undekan | - | 1101 | 2054 | 1,92 |
| 25 | UK8 | - | 1121 | 2102 | 1,93 |
| 26 | 1,7,7-trimethylbicyklo[2,2,1]heptan-2-on | kafr | 1151 | 2174 | 3,00 |
| 27 | (4 <i>E</i>)-dodecen | - | 1193 | 2274 | 1,90 |
| 28 | <i>n</i> -dekanal | - | 1205 | 2302 | 2,40 |
| 29 | 3-hydroxybutan-2-on* | acetoin* | 1223-1454 | 2338-2670 | 1,2-1,32 |
| 30 | (3 <i>Z</i>)-dodecen | - | 1232 | 2354 | 1,84 |
| 31 | UK9 | - | 1274 | 2438 | 1,61 |
| 32 | 1-acetyl-4-methylbenzen | <i>p</i> -acetyltoluen | 1277 | 2442 | 2,38 |
| 33 | tridekan | - | 1301 | 2490 | 1,61 |
| 34 | 8-isopropyl-1,3-dimethyl-tricyklo[4.4.0.0(2,7)]dec-3-en | α-kopaen | 1392 | 2610 | 1,57 |
| 35 | tetradekan | - | 1406 | 2626 | 1,47 |
| 36 | UK10 | - | 1428 | 2646 | 1,44 |
| 37 | 4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyklo[7.2.0]undec-4-en | β-karyofylen | 1445 | 2662 | 1,59 |
| 38 | <i>cis</i> -2,6-dimethyl-6-(4-methylpent-3-enyl)-bicyklo[3.1.1]hept-2-en | <i>cis</i> -α-bergamoten | 1454 | 2670 | 1,55 |
| 39 | <i>trans</i> -2,6-dimethyl-6-(4-methylpent-3-enyl)-bicyklo[3.1.1]hept-2-en | <i>trans</i> -α-bergamoten | 1463 | 2678 | 1,53 |
| 40 | 1,1,7-trimethyl-4-methylenedekahydro-(1 <i>H</i>)-cyklopropan[e]azulen | aromadendren | 1489 | 2702 | 1,58 |
| 41 | (3 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-3,7,11-trimethyldodeka-1,3,6,10-tetraen | (<i>E,E</i>)-α-farnesen | 1523 | 2734 | 1,51 |
| 42 | 1,2,3,5,6,8-α-hexahydro-1-isopropyl-4,7-dimethylnaftalen | δ-kadinen | 1547 | 2746 | 1,56 |
| 43 | 2-methylpropanová kyselina | - | 1631 | 2802 | 1,48 |

* jedná se o další frakci látky, pravděpodobně dimer

Pro semikvantitativní analýzu byla použita metoda vnitřního standardu, při níž je do vzorku přidáno známé množství vybrané látky, tzv. vnitřního standardu. Množství analytu lze potom vypočítat ze vztahu:

$$m_{AV} = (A_{AV} / A_{VS}) \cdot m_{VS} \cdot f$$

kde m_{AV} je množství analytu ve vzorku, A_{AV} plocha píku analytu ve vzorku, A_{VS} plocha píku vnitřního standardu ve vzorku, m_{VS} množství vnitřního standardu ve vzorku, f poměr odezvových faktorů. Ten odpovídá vynásobeným podílům hmotnosti a plochy vnitřního standardu a analytu. Tudíž jsou-li odezvové faktory obou těchto látek stejné, jejich poměr $f = 1$. Předpokládáme-li toto, můžeme člen f z výše uvedeného vztahu vynechat a pro výpočet množství jednotlivých látek použít přímé úměry, tj.

$$m_{AV} = (A_{AV} / A_{VS}) \cdot m_{VS}$$

Tento předpoklad je pro užití této metody v případě tohoto výzkumu nutný, protože ke zjištění odezvových faktorů všech látek by byla potřeba syntetické standardy všech těchto látek, jejichž pořizovací cena by byla poměrně vysoká, některé by musely být syntetizovány z výchozích látek v laboratoři a práci by to značně prodloužilo. V případě práce byly tudíž všechny odezvové faktory identifikovaných těkavých látek považovány za shodné s odezvovým faktorem vnitřního standardu, konkrétně dodekanu. Tento postup byl publikován v literatuře [50,51]. Dodekan byl zvolen nejen pro svůj vyhovující eluční čas a ostatní retenční vlastnosti, ale i kvůli své dostupnosti a relativně velmi dobré stálosti při správném skladování. To, že se látka eluuje ve specifické oblasti, kde se nemůže překrývat s žádnou látkou obsaženou ve vzorku, je nutná podmínka pro její použití jakožto vnitřní standard. Tudíž samozřejmě ani látka, která je použita jako standard, nesmí být původní součástí vzorku, což bylo předem ověřeno.

Jelikož se naměřené plochy těchto standardů od sebe lišily maximálně o $\pm 25 \%$, lze usuzovat na poměrně dobře reprodukovatelná a důvěryhodná data s přihlédnutím ke složitým podmínkám odběru a skladování v tropech. Tyto odchylky lze přičíst drobným odchylkám při pipetování, či nestejnoměrnému odpařování při analýze, velmi zřídka případné minimální koeluci s jinými látkami vycházejícími z kolony.

V níže uvedených tabulkách (Tab. 4.2a a 4.2b) jsou vypočítaná průměrná množství jednotlivých těkavých složek (č. 1–43) a jejich směrodatné odchylky σ vždy ze tří měření. Tato množství odpovídají produkci jednoho květu po dobu měření, tj. 12 hodin.

Tab. 4.2a Vypočtená množství m a směrodatné odchylky σ látek 1 – 22 produkovaná květy *C. blattophila*

| Č. Látka | Samec - $m \pm \sigma$ [ng] ^a | Samice 1.noc - $m \pm \sigma$ [ng] ^a | Samice den - $m \pm \sigma$ [ng] ^a | Samice 2.noc - $m \pm \sigma$ [ng] ^a |
|---------------------------|--|---|---|---|
| 1 pentan-1-al | 31 ± 19 | 50 ± 50 | 31 ± 10 | 0 ± 0 |
| 2 heptan | 0 ± 0 | 1030 ± 714 | 136 ± 96 | 0 ± 0 |
| 3 UK1 | 143 ± 94 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 4 UK2 | 383 ± 273 | 144 ± 85 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 5 hepta-1,5-dien | 13 ± 7 | 28 ± 31 | 32 ± 12 | 5 ± 4 |
| 6 acetoin | 10454 ± 6130 | 3165 ± 2329 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 7 UK3 | 112 ± 63 | 110 ± 56 | 238 ± 134 | 18 ± 13 |
| 8 UK4 | 76 ± 72 | 0 ± 0 | 138 ± 122 | 0 ± 0 |
| 9 UK5 | 96 ± 79 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 10 UK6 | 16 ± 12 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 11 butan-2,3-diol | 256 ± 197 | 46 ± 19 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 12 hexan-1-al | 151 ± 45 | 142 ± 51 | 95 ± 49 | 33 ± 14 |
| 13 1-nitro-3-methylbutan | 17 ± 12 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 14 hexan-2,5-dion | 88 ± 46 | 46 ± 33 | 115 ± 64 | 28 ± 12 |
| 15 α-pinen | 134 ± 29 | 39 ± 10 | 883 ± 756 | 86 ± 62 |
| 16 kamfen | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 14 ± 7 | 0 ± 0 |
| 17 UK7 | 9 ± 6 | 0 ± 0 | 11 ± 7 | 3 ± 3 |
| 18 β-pinen | 44 ± 12 | 13 ± 4 | 293 ± 271 | 31 ± 24 |
| 19 6-methylhept-5-en-2-on | 49 ± 10 | 48 ± 20 | 46 ± 16 | 58 ± 42 |
| 20 myrcen | 39 ± 7 | 11 ± 3 | 84 ± 52 | 83 ± 52 |
| 21 oktan-1-al | 18 ± 2 | 19 ± 7 | 49 ± 16 | 21 ± 8 |
| 22 limonen | 29 ± 10 | 27 ± 5 | 67 ± 44 | 21 ± 7 |

^a množství jsou udána v nanogramech produkované látky za 12 hodin odběru, odpovídající právě jednomu květu rostliny

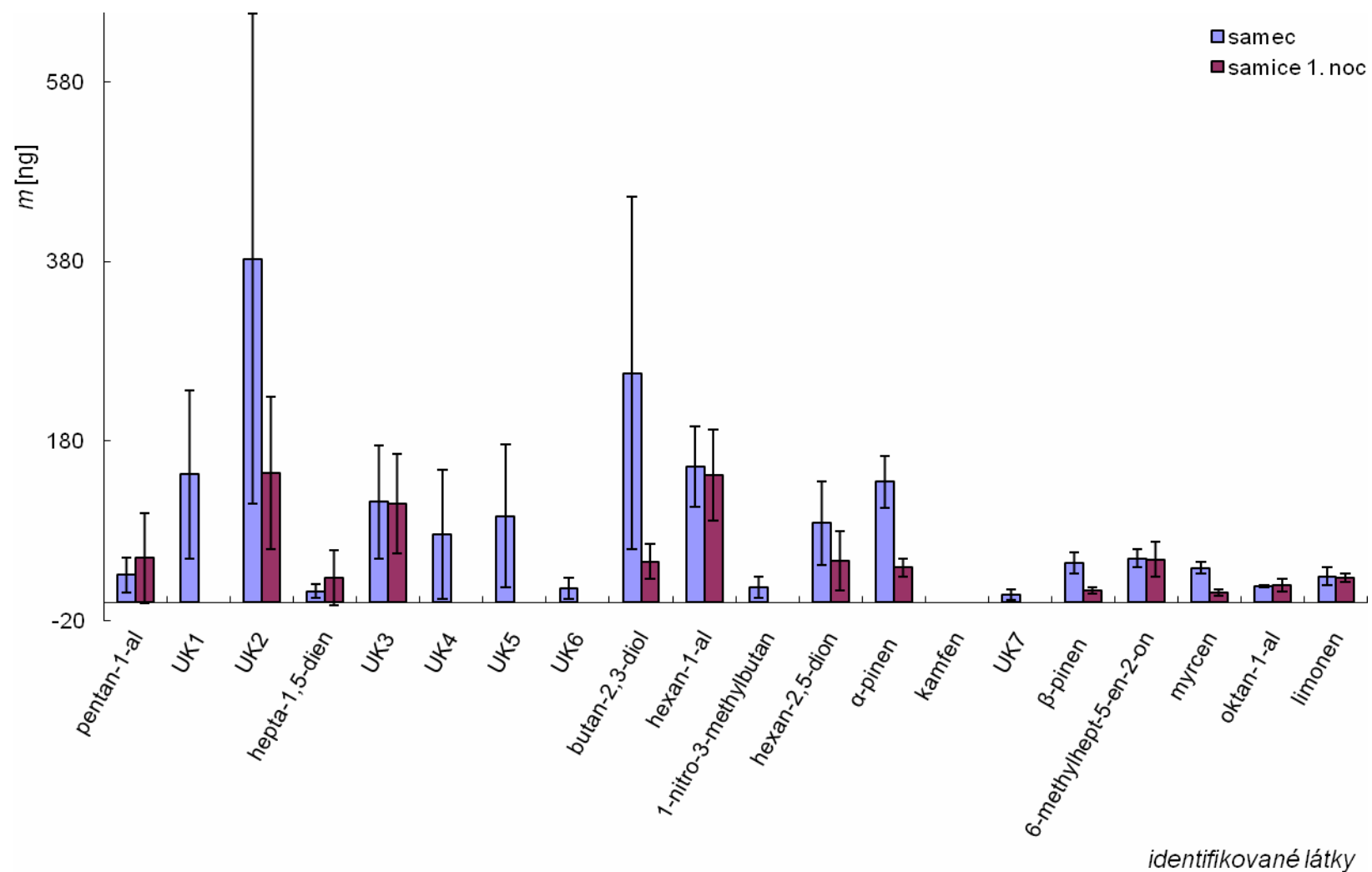
Tab. 4.2b Vypočtená množství m a směrodatné odchylky σ látek 23 – 43 produkovaná květy *C. blattophila*

| Č. Látka | Samec - $m \pm \sigma$ [ng] ^a | Samice 1.noc - $m \pm \sigma$ [ng] ^a | Samice den - $m \pm \sigma$ [ng] ^a | Samice 2.noc - $m \pm \sigma$ [ng] ^a |
|--|--|---|---|---|
| 23 (<i>E</i>)- β -ocimen | 0 \pm 0 | 8 \pm 1 | 17 \pm 10 | 6 \pm 1 |
| 24 undekan | 294 \pm 104 | 0 \pm 0 | 121 \pm 88 | 0 \pm 0 |
| 25 UK8 | 27 \pm 4 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 9 \pm 6 |
| 26 kafr | 188 \pm 39 | 47 \pm 12 | 63 \pm 5 | 93 \pm 61 |
| 27 (<i>4E</i>)-dodecen | 27 \pm 2 | 17 \pm 2 | 22 \pm 2 | 12 \pm 11 |
| 28 <i>n</i> -dekanal | 45 \pm 8 | 64 \pm 39 | 61 \pm 31 | 48 \pm 30 |
| 29 acetoin* | 17 \pm 24 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 |
| 30 (<i>3Z</i>)-dodecen | 23 \pm 11 | 37 \pm 12 | 52 \pm 32 | 20 \pm 9 |
| 31 UK9 | 8 \pm 4 | 6 \pm 1 | 5 \pm 4 | 5 \pm 2 |
| 32 <i>p</i> -acetyltoluen | 45 \pm 33 | 0 \pm 0 | 31 \pm 14 | 11 \pm 11 |
| 33 tridekan | 149 \pm 68 | 0 \pm 0 | 80 \pm 57 | 0 \pm 0 |
| 34 α -kopaen | 401 \pm 255 | 153 \pm 92 | 197 \pm 106 | 124 \pm 151 |
| 35 tetradekan | 70 \pm 18 | 0 \pm 0 | 34 \pm 24 | 0 \pm 0 |
| 36 UK10 | 18 \pm 5 | 11 \pm 2 | 26 \pm 2 | 9 \pm 6 |
| 37 β -karyofylen | 164 \pm 49 | 58 \pm 47 | 72 \pm 50 | 30 \pm 20 |
| 38 <i>cis</i> - α -bergamoten | 41 \pm 20 | 18 \pm 7 | 32 \pm 23 | 16 \pm 7 |
| 39 <i>trans</i> - α -bergamoten | 12 \pm 12 | 0 \pm 0 | 10 \pm 4 | 0 \pm 0 |
| 40 aromadendren | 26 \pm 22 | 22 \pm 13 | 24 \pm 25 | 15 \pm 9 |
| 41 (<i>E,E</i>)- α -farnesen | 50 \pm 20 | 17 \pm 12 | 36 \pm 28 | 0 \pm 0 |
| 42 δ -kadinen | 11 \pm 8 | 0 \pm 0 | 12 \pm 12 | 0 \pm 0 |
| 43 2-methylpropanová kys. | 103 \pm 48 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 | 0 \pm 0 |

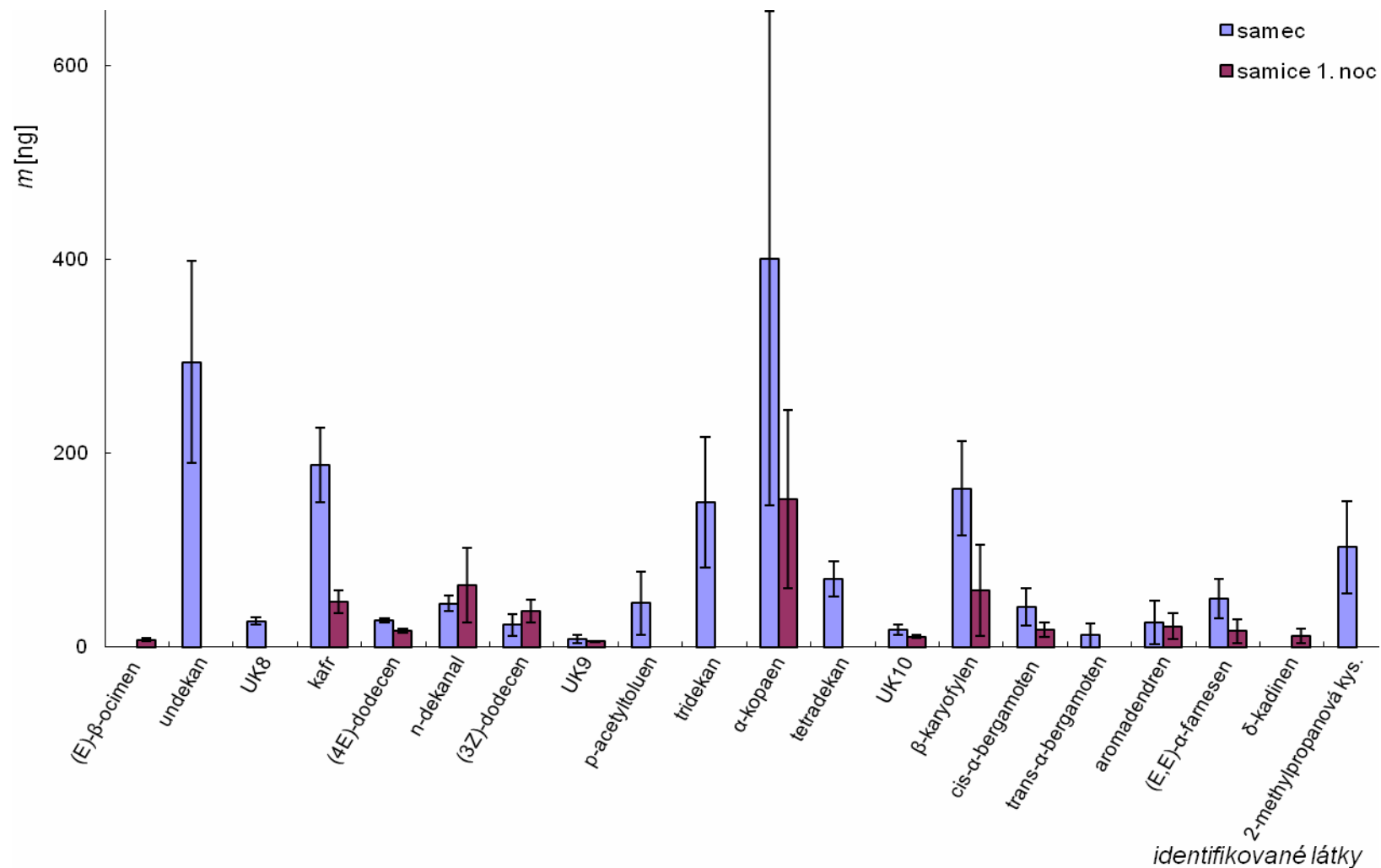
^a množství jsou udána v nanogramech produkované látky za 12 hodin odběru, odpovídající právě jednomu květu rostliny

Z vypočtených hodnot bylo sestaveno šest sloupcových grafů. Tři grafy ukazují přehledně množství látek v nanogramech vyprodukované samčím a samičím květem v prvním stádiu, tj. první noc otevření květu (Obr. 4.2a, 4.2b a 4.2c). Další tři ukazují množství těkavých látek opět v nanogramech vyprodukované pouze samičími květy, a to ve všech třech stádiích kvetení (1. noc, den a 2. noc, viz Obr. 4.3a, 4.3b a 4.3c). Látky v grafech jsou řazeny, stejně jako výše uvedené tabulky, podle retenčních indexů, čemuž popř. odpovídá i řazení dle retenčních časů v první dimenzi. S ohledem na množství látek bylo nutno (stejně jako v případě tabulek) rozdělit identifikované látky do tří částí, tudíž do tří grafů. V posledním typu grafu (4.2c a 4.3c) jsou prezentovány látky, které dosahovaly takových množství v některých ze stádií květu, že by vůči nim další látky byly stěží viditelné. Jedná se o heptan, který je první noc u samice v takovém množství, že by ostatní látky vizuálně zanikaly. Otázkou je, je-li jeho produkce, vzhledem ke značně velké směrodatné odchylce, skutečně taková, nebo jednalo-li se o nějakou formu znečištění např. z prostředí odběru nebo laboratoře. Totéž se týká α -pinenu, který dosahuje velmi vysokého podílu ve vůni u samičího květu přes den. Ze stejných důvodů je odděleně také prezentován acetoin a jeho pravděpodobný dimer, který byl identifikován u jednoho samčího vzorku a jeho výskyt bude diskutován níže.

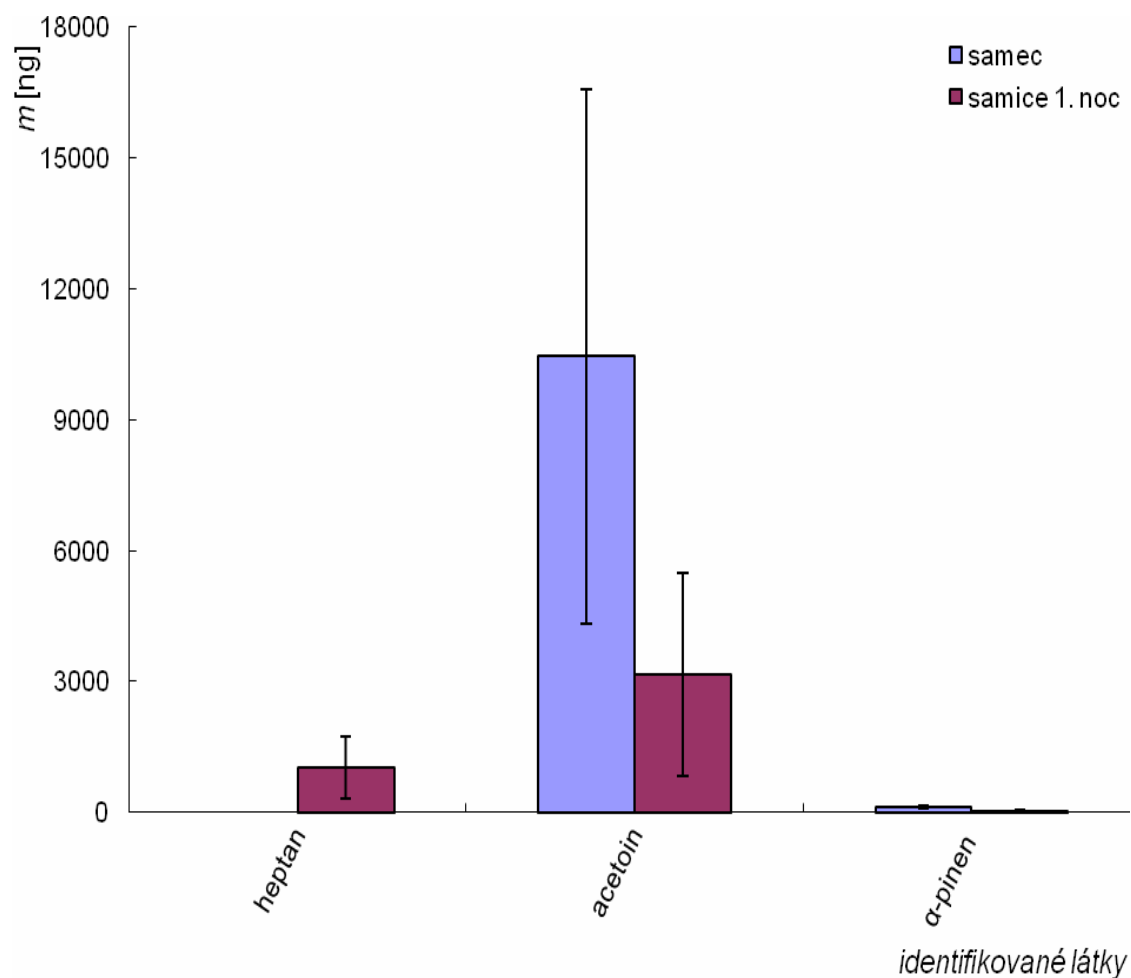
Data ukázala poměrně vysokou variabilitu analyzovaných vzorků. Není jasné, zda tato variabilita odráží individuální variabilitu ve vůních květů nebo variabilitu metodiky odběru ve složitých terénních podmínkách. V každém případě by bylo vhodné v dalších měřeních počítat s více opakováními tak, aby bylo možné stanovit statisticky signifikantní rozdíly.



Obr. 4.2a - Porovnání množství látek (1–22) produkovaných samcem a samicí v 1. stádiu květu

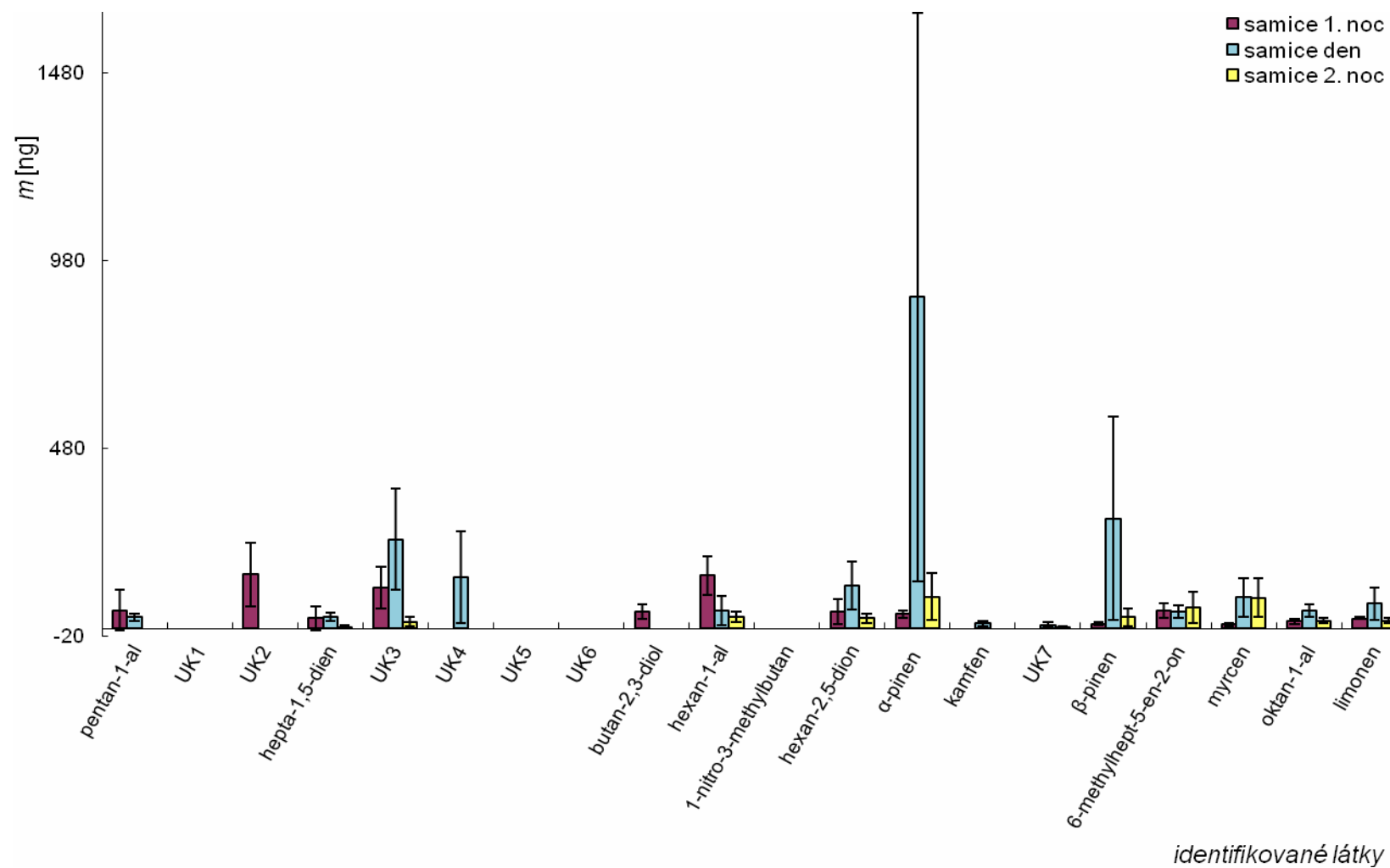


Obr. 4.2b - Porovnání množství látek (23–43) produkovaných samcem a samicí v 1. stádiu květu

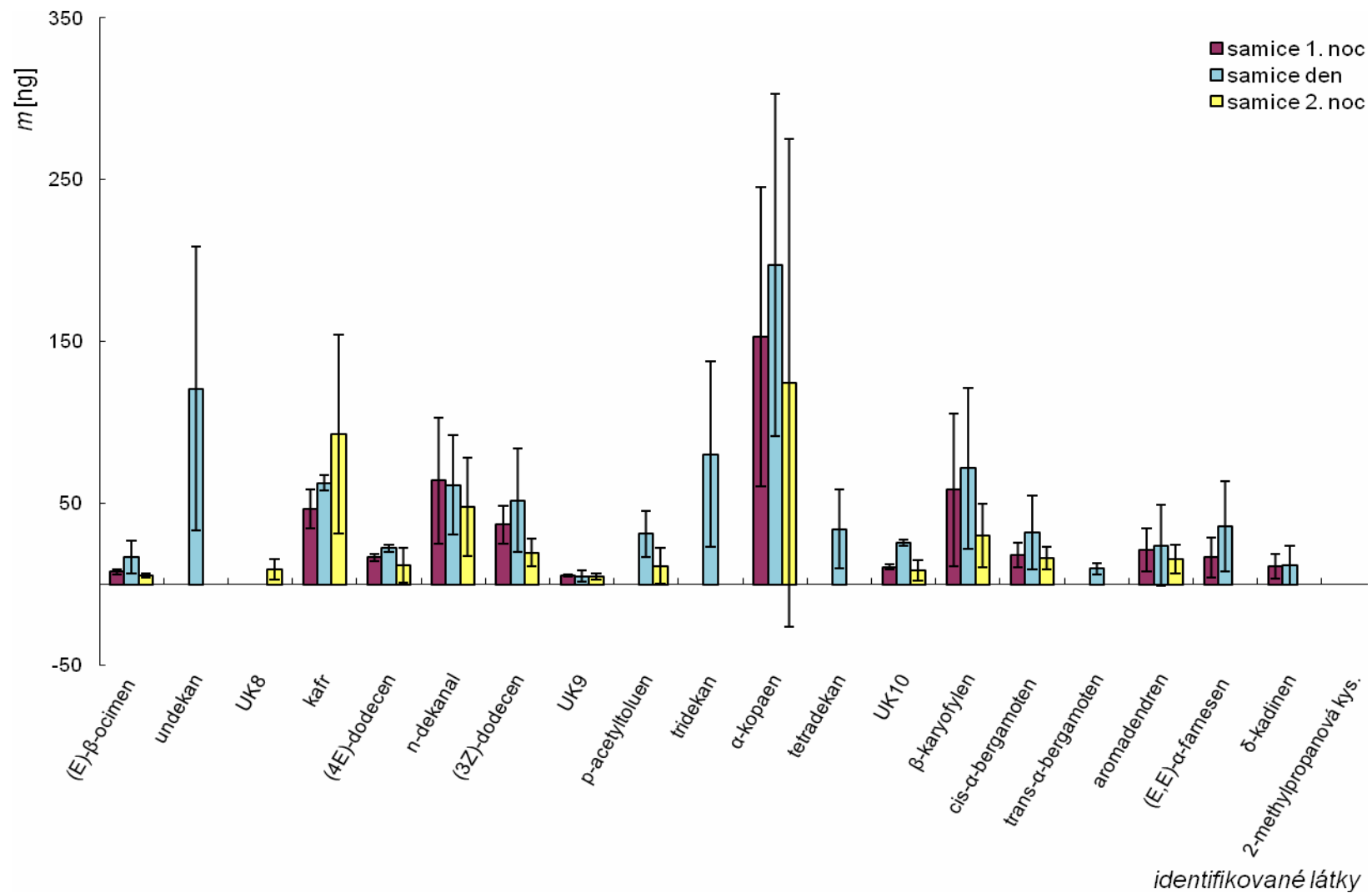


Obr. 4.2c - Porovnání množství látek (2, 6 a 15) produkovaných samcem a samicí v 1. stádiu květu

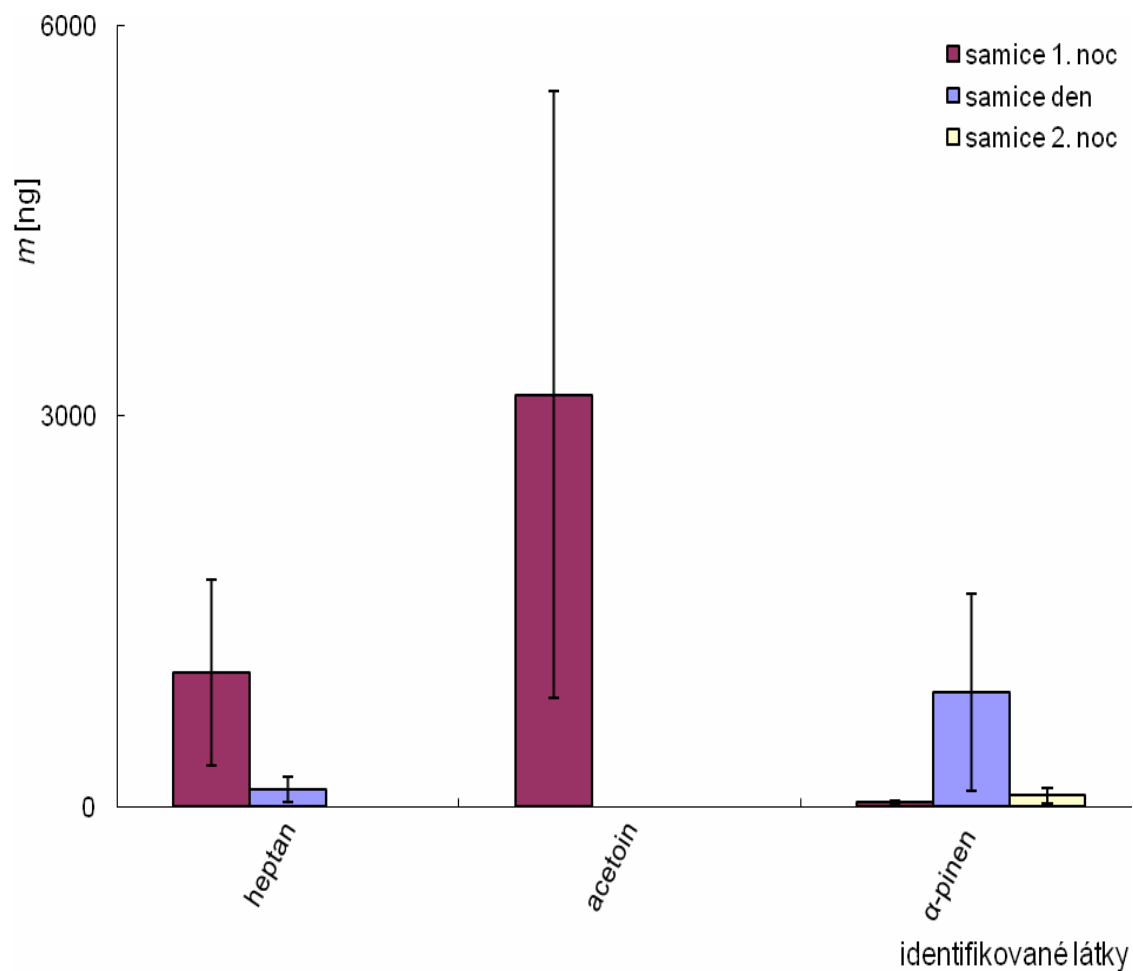
Grafy 4.2a - 4.2c shrnují všechny produkované látky květy samce a samice *C. blattophila*. Na ose x jsou názvy těchto identifikovaných látek, sloupce ukazují průměrná množství v nanogramech. Svislé ohraničené čáry ve středu sloupců ukazují velikosti směrodatných odchylek ze tří měření.



Obr. 4.3a - Porovnání množství látek (1–22) produkovaných samicí během všech tří stádií květu



Obr. 4.3b - Porovnání množství látek (23–43) produkovaných samicí během všech tří stádií květu



Obr. 4.3c - Porovnání množství látek (2, 6 a 15) produkovaných samcem a samicí v 1. stádiu květu

Grafy 4.3a - 4.3c shrnují všechny produkované látky květy samice *C. blattophila* ve všech třech stádiích květu. Na ose x jsou názvy těchto identifikovaných látek, sloupce ukazují průměrná množství v nanogramech. Svislé ohraničené čáry ve středu sloupců ukazují velikosti směrodatných odchylek ze tří měření.

Řešení problematiky neidentifikovaných látek (UK), kterých je celkem 10, je nedílnou součástí při analýze nových semiochemikálií. V takto poměrně složitých směsích je totiž velmi obtížné při první analýze určit chemické struktury všech složek. Látky UK1 a UK2 jsou dle svého spektra a retenčního chování nejspíše frakcemi, směsmi, prekurzory či metabolity acetoinu, kterého se především ve vůni samčích květů vyskytuje značné množství. Tudíž je poměrně značný výskyt těchto zatím blíže neidentifikovaných látek zaznamenán především u květů samčích, popř. pak v daleko menší míře u samice během první noci kvetení. UK3, 4, 6, 8, 9 a 10 jsou látky, mající charakteristické píky o m/z 41, 43, 57. Jedná se nejspíše o látky s delším acyklickým řetězcem, patrně substituované kratšími skupinami typu methyl až propyl, či jinými podobnými skupinami. Tomu odpovídají i příslušné relativně nízké retenční časy ve druhé dimenzi. Vzhledem k nepravidelnému poklesu intenzit výše zmiňovaných iontů se nemůže jednat o nerozvětvené uhlovodíky. UK5 je látka, která se eluuje mezi heptanem a oktanem, mohlo by se jednat o nitrovaný nebo jinak substituovaný acyklický uhlovodík. UK7 se eluoval v první dimenzi mezi nonanem a dekanem, charakteristickým píkem je výrazná m/z 57, více nelze přesněji o látce říci.

Čtyři aldehydy, které byly identifikovány, konkrétně pentan-1-al, hexan-1-al, oktan-1-al a *n*-dekanal jsou v různých množstvích přítomny ve vzorcích všech čtyř typů, kromě pentanalu, který se vůbec nevyskytuje ve vůni samičího květu 2. stádia. Ve všech ostatních vzorcích je množství podobné, okolo 30 ng, včetně samice 1. stádia, vzhledem k velké směrodatné odchylce měření. U samičího květu je množství hexanalu v čase klesající, nejvyšší je u květu samčího. Oktanalu se vyskytovalo ve vzorcích poměrně malé množství, nevyšší bylo u samice přes den, a to okolo 50 ng. Na této hladině se pohybovalo i množství *n*-dekanalu u všech čtyř stádií.

Jediným identifikovaným alkoholem byl butan-2,3-diol. Vyskytuje se poměrně ve značném množství (okolo 250 ng) u samčích květů, ovšem se značnou směrodatnou odchylkou. U samice 1. noc se ještě vyskytuje zhruba pětinové množství, dále už ovšem zcela chybí.

1-nitro-3-methylbutan se vyskytuje pouze v minimálním množství u samce, je ovšem otázkou, zda-li se nejedná spíše o znečištění, protože takováto látka nebývá obvyklou složkou vůní květů rostlin.

Mezi další identifikované látky patří alifatické sloučeniny, konkrétně heptan, hepta-1,5-dien, undekan, (4*E*)-dodecen, tridekan a tetradekan. Heptan byl objeven pouze u samice, především v prvním stádiu kvetení přes noc, kdy dosahuje hodnot okolo 1 µg, ovšem opět se značnou směrodatnou odchylkou. Poté přes den jeho množství klesá, až druhý večer zcela mizí. Heptan nebývá typickou složkou vůní květů a jeho přítomnost v takovém množství je poměrně překvapivá. Hepta-1,5-dien byl přítomen u všech čtyř typů vzorků, ovšem jeho množství nedosahovalo významných hodnot, nejvyšší bylo u samice během dne. Undekan byl objeven u samce v poměrně velkém množství (okolo 300 ng), pak už jen u samice přes den v množství zhruba polovičním. (4*E*)-dodecen je opět přítomen pouze ve stopovém množství u všech 4 druhů vzorků. (3*Z*)-dodecen má podobný výskyt s tím, že maxima dosahuje u samice během dne, okolo 50 ng. Tridekan a tetradekan vykazují velmi podobné schéma výskytu, přičemž prvně jmenovaný uhlovodík má obsah ve vzorku zhruba dvojnásobný, tj. u samce okolo 150 ng a u samice přes den okolo 80 ng. U jiných stádií se nevyskytují. Lze tudíž obecně usuzovat na výskyt jednoduchých uhlovodíků především u samce a také samice přes den, výjimku tvoří pouze heptan.

Aromatický uhlovodík *p*-acetyltoluen se opět vyskytuje především u samce a v menším množství pak u samice ve dne a 2. noc. Nejspíše se nejedná o nějak zásadně významnou komponentu vůně *C. blattophila*.

2-methylpropanová kyselina se vyskytuje v množství okolo 0,1 µg a to pouze u samce. Tato látka je poměrně častou komponentou feromonů hmyzu, byla publikována i u jedné jednoděložné rostliny, konkrétně u jednoho druhu toulitky, *Anthurium longipeltatum* [14].

Nejpočetněji zastoupenou skupinou látek jsou dle očekávání terpeny, velmi časté látky vyskytující se u rostlin, ať už jako sekundární metabolity, či látky s jinými funkcemi. Dále je lze ještě rozdělit dle počtu isoprenových jednotek na monoterpeny, kterých bylo ve vůních identifikováno sedm, a seskviterpeny, jichž byl nalezen tentýž počet.

Monoterpen α -pinen, který je mimo jiné spolu s β -pinenem složkou pryskyřice borovice, je především u samice přes den produkován v hojném množství, ovšem opět se značnou směrodatnou odchylkou, tudíž jejich skutečný obsah ve vůni může být diskutabilní. Tím spíše, že látka je často přítomna i v listech a větvích rostliny, což

prokázaly i slepé pokusy. Navíc se také může uvolňovat ve zvýšené míře při poranění rostliny, vyšší míře stresu, atd. Další monoterpen kamfen je přítomen pouze ve dne a to v zanedbatelném množství. Myrcen je přítomen opět především přes den a také druhou noc u samice v množství okolo 80 ng. U samce je pak jeho množství zhruba poloviční. Limonen opět vykazuje velmi podobný výskyt jako ostatní monoterpeny, přičemž jeho maximum přes den dosahuje pouze 70 ng. (*E*)- β -ocimen je látka, která často funguje jako feromon, například u různých druhů vrtulí, zde je však přítomna pouze v zanedbatelném množství. Kafr, původně získáván ze dřeva tropického stromu kafrovníku a vyskytující se v silici bazalky, rozmarýnu, šalvěje a v mrkvi, je nejvíce zastoupen v květu samčím (až 200 ng) a v menší míře taktéž ve všech stádiích květu samičího.

Obecným rysem pro monoterpeny je jejich zvýšená produkce do vůně přes den, čímž se značně liší od ostatních skupin semiochemikálií. Jelikož samčí květy kvetou pouze jednu noc a poté uvadají, nejsou pro ně tyto látky tak důležité jako pro květy samičí. Důvodem této strategie by pro rostliny mohl být důvod lákání jiných druhů opylovačů, než které rostlina využívá v průběhu noci.

Seskviterpen α -kopaen je přítomen ve značném množství u samce, tj. až 0,4 μ g, u samice jsou množství ve všech stádiích zhruba poloviční, ovšem vzhledem k odchylkám i značně variabilní. β -karyofylen má velmi podobné schéma výskytu jako předchozí látka, ovšem při zhruba třetinových množstvích. *Cis*- α -bergamoten, opět přítomen v maximálním množství u samce, vzhledem k ostatním seskviterpenům je však značně nižší (40 ng). Jeho další isomer *trans*- α -bergamoten je přítomen pouze u samce a samice ve dne, ovšem v zanedbatelných množstvích (10 ng). Aromadendren je také zastoupen poměrně málo, ale za to u všech čtyř vzorků velmi podobně, okolo 25 ng. (*E,E*)- α -farnesen se svým množstvím i trendem velmi podobá *cis*- α -bergamotenu. Stejně tak jako δ -kadinen *trans*- α -bergamotenu.

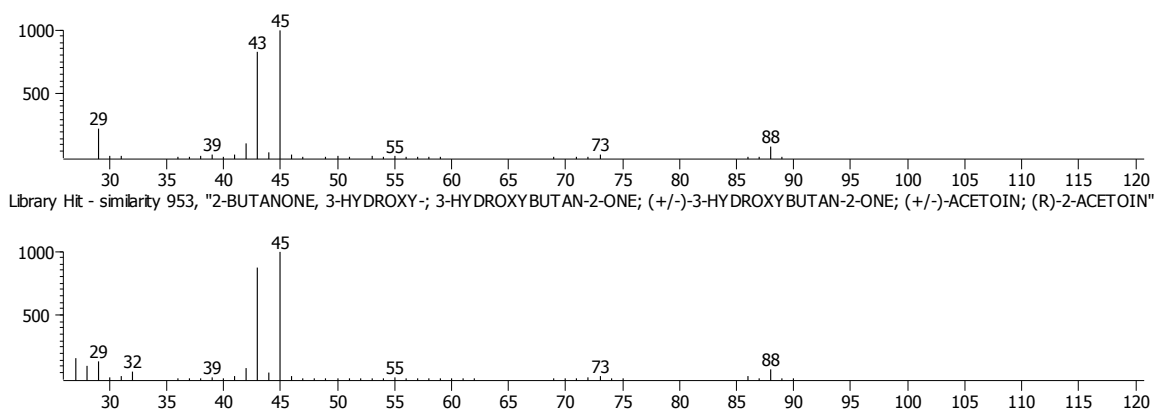
Pro seskviterpeny obecně platí to, že nejvyšších hodnot dosahují u samčích květů a u samičích mají téměř stejný výskyt ve všech stádiích kvetení.

Poslední, ovšem z hlediska důležitosti asi nejvýznamnější skupinou látek (především kvůli acetoinu) jsou ketony. Byly identifikovány celkem tři, přičemž právě acetoin ve dvou formách. Hexan-2,5-dion, látka přítomná ve všech druzích vzorků, je přítomna především ve vůních denních (okolo 120 ng), dále pak v menších množstvích i v noci a

to především u samce. 6-methylhept-5-en-2-on má u všech vzorků obsah okolo 50 ng.

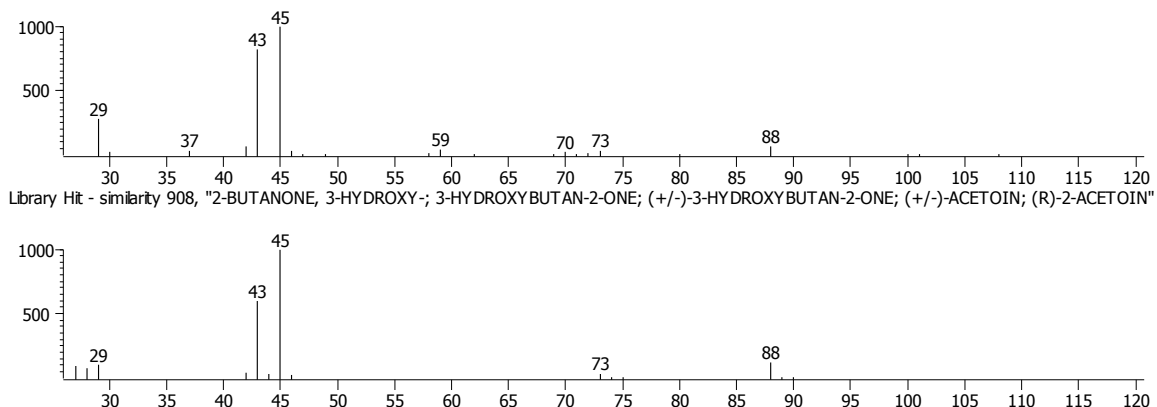
Nejzajímavější a u samce a samice během 1. noci i nejvíce zastoupenou látkou je 3-hydroxybutan-2-on, triviálně nazývaný acetoin. Jeho množství u samce přesahuje až o dva až tři řády ostatní složky vůně. Množství produkovaného acetoinu je značně variabilní, což může mít velmi mnoho příčin, jako je kondice rostliny, stanoviště, teplota, vlhkost a další. Samice produkuje během první noci zhruba třetinové množství acetoinu, přes den již ale jeho přítomnost zcela mizí a ani druhou noc květu samičí rostliny se již neobjevuje. Zajímavý je i atypický výskyt acetoinu v chromatogramu odpovídající RI 1223-1454 (běžný je okolo 710) u jednoho ze samčích vzorků. Lze se domnívat, že by se mohlo jednat o dimer acetoinu, ten se takto běžně vyskytuje v pevném skupenství a je takto i komerčně dostupný jako standard. Spektrum je téměř totožné se spektrem převažující formy acetoinu, viz Obr. 4.4a a 4.4b níže.

Peak True - sample "* CLUSIA 2012: B 21 M 35 N 14.8. 1X 12 C.1:1", peak 29, at 674 , 3,670 sec , sec



Obr. 4.4a - Porovnání spektra acetoinu produkovaného samcem s knihovním spektrem

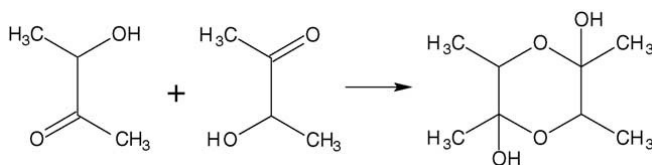
Peak True - sample "* CLUSIA 2012: B 21 M 35 N 14.8. 1X 12 C.1:1", peak 510, at 2458 , 1,290 sec , sec



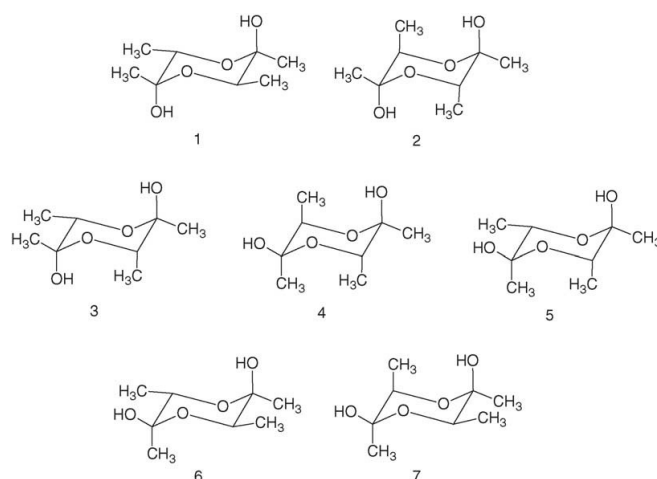
Obr. 4.4b - Porovnání spektra předpokládaného dimeru acetoinu produkovaného samcem s knihovním spektrem

Obr. 4.4a a 4.4b ukazují příklady MS spekter acetoinu při měření ve vzorku samčího květu. Na ose x jsou vidět píky iontů, jejichž m/z značí číslo, na ose y je intenzita píků.

Podle publikovaného článku [52] je možný vznik a existence dimerů acetoinu (viz Obr. 4.5) i za vyšších teplot a to především při větším množství acetoinu v roztoku. Může existovat až sedm diastereomerů dimeru acetoinu (viz Obr. 4.6) a může dále docházet k jejich následné oxidaci. Vzhledem k tomu, že se tento jev vyskytl pouze u jednoho vzorku a množství acetoinu v této formě bylo velmi malé, jedná se spíše o zajímavost a její možné vysvětlení. Vznik vyšších polymerů než dimerů u acetoinu prokázán nebyl.



Obr. 4.5 - Dimerizace acetoinu

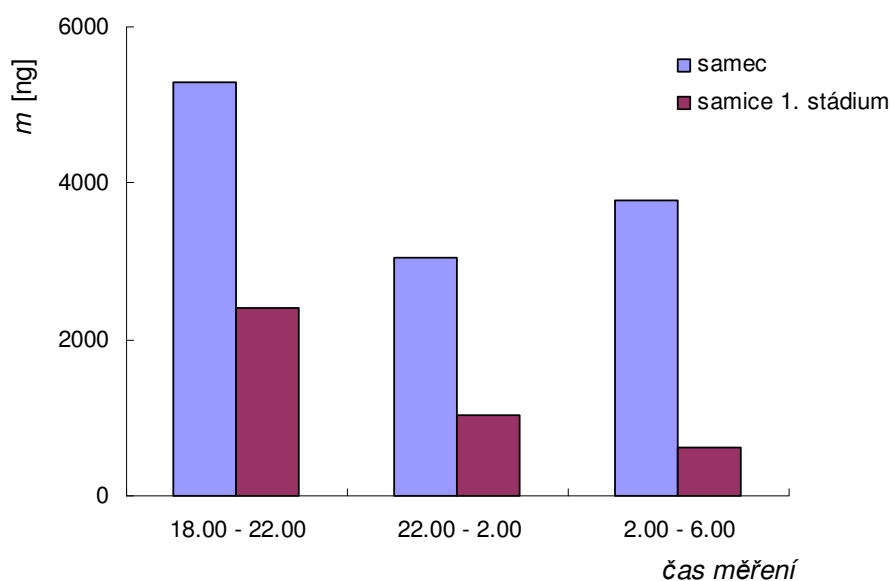


Obr. 4.6 - Diastereoisomery dimeru acetoinu

Dalším úkolem bylo zjistit, jak kolísá množství produkovaného acetoinu v průběhu noci. Období 12 hodin noci bylo nahrazeno třemi úseky po čtyřech hodinách, po kterých se filtry měnily a bylo tudíž možné zjistit, jako množství acetoinu je produkováno květy večer, v noci a k ránu. Květy začínají rozkvétat před západem slunce, zhruba kolem 17.00 (noc ve Francouzské Guayaně je přibližně od 18.30 do 6.30). Vypočtená množství přehledně shrnuje Tab. 4.3 a graf (Obr. 4.7). Množství produkovaného acetoinu muselo být přepočítáno na 1 květ, u samice byly totiž v sáčku 2 květy. Jelikož bylo možno provést analýzu pouze na základě jednoho měřeného vzorku pro odpovídající rostlinu a čas, není možno určit žádné směrodatné odchylky a měření může být tudíž značně nepřesné, jedná se proto pouze o první pokus nastínění vývoje produkce acetoinu během první noci kvetení.

Tab. 4.3 – Produkce acetoinu u květu *C. blattophila* v závislosti na denní době odběru

| druh květu | $m_{\text{acetoin}} (\mu\text{g} / 4 \text{ h})$ | | |
|-------------------|--|--------------|-------------|
| | 18.00 - 22.00 | 22.00 - 2.00 | 2.00 - 6.00 |
| samec | 5,29 | 3,05 | 3,78 |
| samice 1. stádium | 2,42 | 1,02 | 0,61 |



Obr. 4.7 - Závislost množství produkovaného acetoinu na době odběru

Sloupce vyjadřují množství acetoinu v ng, jednotlivé úseky na ose x odpovídají časovým obdobím měření, 1 měření, bez odchylek.

Z trendu u samičího květu je patrný pokles od večera směrem k ránu, na což navazují i měření provedená přes den a druhou noc, kde již acetoin zcela chybí. Zajímavý je i vývoj vzhledem k produkci samčího květu, když v období mezi 18. a 22. hodinou je nejprve produkce samice zhruba poloviční, mezi 22. a 2. hodinou ranní už jen třetinová a v ranních hodinách (2.00 až 6.00) již pouze přibližně pětina.

Samčí květ vykazuje také nejvyšší produkci (více než 5 μg) během večerních 4 hodin, poté lze zaznamenat znatelný pokles asi o 40 %. Zdánlivý nárůst v ranních hodinách by mohl být pouze náhodný, vzhledem pouze k jednomu měření, spíše by se

dala očekávat podobná nebo mírně nižší hodnota než u období ve středu noci (22.00 - 2.00). Předběžné zjištění, že obě pohlaví produkují acetoin v nejvyšší míře v období bezprostředně po soumraku, tj. mezi 18. a 22. hodinou, by mělo být potvrzeno opakovaným měřením s více opakování.

Volba rozpouštědla je výsledkem kompromisu, každé má své výhody a nevýhody. Hexan byl vybrán pro veškeré pro tuto práci prováděné analýzy proto, že dobře rozpouští většinu těkavých látek, nerozpouští adsorbenty (s ohledem na použitý adsorbent - Hayesep Q). Hexan je také poměrně stabilní v průběhu analýzy. Mezi jeho hlavní nevýhody patří to, že díky svým dobrým rozpouštěcím vlastnostem se v něm často nachází poměrně hodně nečistot, které by vzhledem k velké citlivosti analýzy mohly být problémem. Tím se ale předešlo odečtem slepých pokusů od příslušných měření. Před použitím byl navíc předestilován. Může také hůře rozpouštět některé cyklické sloučeniny, jako jsou indol a vanilin. Pentan je levnější a čistší, ale je mnohem snáze se ztrácí odpařováním. Diethylether je lepší rozpouštědlo pro vanilin a podobné látky, ale je často nečistý, hořlavý, velmi těkavý (odpaření během několika sekund) a od jeho užívání se v současnosti spíše upouští. Není vhodný pro analýzu GC×MS. Methylenchlorid je méně těkavý, ale rozpouští některé sorbenty běžně používané ke sběru semiochemikálií a je velmi toxický [53]. Aceton má podobné charakteristiky jako hexan, byl navíc použit při některých předchozích analýzách u *Clusia* aff. *sellowiana* [13]. Pro dosažení maximální rozpustnosti a univerzálnějších vlastností by bylo možno také užít např. směsi hexanu a ultra čistého acetonu.

Jak již bylo uvedeno výše, plochy látek v kontrolních odběrech byly odečteny od ploch látek ve vzorcích jim odpovídajících. Slepý pokus byl získán obalením konce větve bez květu a s koncovým listem (popř. i s pupenem) a jímán jako obvyklý pokus. Pro lepší zjištění toho, jaké látky skutečně rostlina produkuje a v jakém množství, by bylo dobré do budoucna odebrat více slepých vzorků a také slepé vzorky, které by byly jímány přes prázdný sáček.

Technika odběru, tj. dynamický headspace, byla zvolena a upravena pro potřeby a možnosti terénních odběrů v prostředí deštného pralesa na základě dobré zkušenosti při podobných odběrech v terénu. Metoda má oproti statické variantě výhodu v proudění vzduchu a jeho výměně v průběhu času, a tudíž možnosti zachycení koncentrovanějších

vzorků na adsorbční materiál. Vzhledem k našim údajům, že produkce těkavých látek je patrně maximální v období po soumraku a poté patrně poklesá, by bylo vhodné uvážit omezení zachytávání těkavých látek pouze na tuto dobu.

5 ZÁVĚR

Pomocí GC×GC MS analýzy bylo zjištěno, že samčí květy *C. blattophila* produkují 39 látek a květy samičí pouze 27 až 35 látek v závislosti na tom, v jakém období rozvoje květu byl odběr prováděn. Celkem bylo zjištěno 43 různých chemických látek. Z toho u deseti látek nebylo možno provést úplnou identifikaci. Vůně obsahují v různých intenzitách monoterpeny (α -pinen, kamfen, β -pinen, myrcen, limonen, (*E*)- β -ocimen, kafr) seskviterpeny (α -kopaen, β -karyofylen, *cis*- α -bergamoten, *trans*- α -bergamoten, aromadendren, (*E,E*)- α -farnesen, δ -kadinen), aldehydy (pentan-1-al, hexan-1-al, oktan-1-al, *n*-dekanal), také čtyři ketony (acetoin a jeho dimer, hexan-2,5-dion, 6-methylhept-5-en-2-on), alkohol butan-2,3,-diol, karboxylová kyselina 2-methylpropanová, alifatické uhlovodíky (heptan, hepta-1,5-dien, undekan, (*4E*)-dodecen, (*3Z*)-dodecen, tridekan, tetradekan), aromatický uhlovodík *p*-acetyltoleu a nitrosloučenina 1-nitro-3-methylbutan.

Byl potvrzen předpoklad, že dominantní látkou ve vůních samčích květů je acetoin, který se vyskytuje také u samičích květů 1. noc kvetení, ale v poněkud menší míře. U samic kvetoucích druhý den zcela chybí. Trend produkce acetoinu je u samce i samice během první noci klesající či místy stagnující, nejvíce je ho produkováno v prvních čtyřech hodinách od otevření květu po soumraku.

U samičích květů jsou ve dne ve velké míře zastoupeny některé monoterpeny, především pineny, seskviterpeny jsou potom produkovány především u samčích květů a u samičích mají zhruba stejný výskyt ve všech stádiích. Samice 1. noc může ve větší míře produkovat také heptan, produkce semiochemikálií samice 2. noc je celkově nízká.

Tab. 5.1 - Přehled nejvíce produkováných látek u jednotlivých druhů květů (shora dolů)

| Samec 1. noc | Samice 1. noc | Samice den | Samice 2. noc |
|---------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| acetoin | acetoin | α -pinen | α -kopaen |
| α -kopaen | heptan | β -pinen | kafr |
| UK2 | α -kopaen | UK3 | α -pinen |
| undekan | UK2 | α -kopaen | myrcen |
| butan-2,3,-diol | hexan-1-al | UK4 | 6-methylhept-5-en-2-on |
| kafr | <i>n</i> -dekanal | heptan | <i>n</i> -dekanal |
| β -karyofylen | β -karyofylen | undekan | hexan-1-al |
| tridekan | pentan-1-al | hexan-2,5-dion | β -pinen |
| UK1 | 6-methylhept-5-en-2-on | hexan-1-al | β -karyofylen |
| α -pinen | kafr | myrcen | hexan-2,5-dion |

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Do Nascimento, R. R.; Morgan, E. D.: Chemicals involved in the communication system of social insect: Their source and methods of isolation and identification, with special emphasis on ants. *Química Nova* **19**, 156–165 (1996).
- [2] Harmatha, J.; Hertweck, Ch.; Chodounská H.; Kasal, A.; Moravcová, J.; Piel J.; Svatoš, A.; Valterová, I.; Žďárek, J.: *Chemie a biochemie přírodních látek*, Praha, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR 2002.
- [3] Hoskovec, M.: Chemická komunikace hmyzu pohledem organického chemika. *Chemické listy* **94**, 897–904 (2000).
- [4] Knudsen, J. T.; Gershenzon, J.; The chemistry diversity of floral scent. *Biology of Floral Scent*, 27–52 (2006).
- [5] Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J.: Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology* **135**, 1893–1902 (2004).
- [6] Pichersky, E.; Noel J. P.; Dudareva, N.: Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science* **311**, 808–811 (2006).
- [7] Pichersky, E.; Gershenzon, J.: The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 237–243 (2002).
- [8] Reinhard, J.; Srinivasan, M. V.; Zhang, S.: Scent-triggered navigation in honeybees. *Nature* **427**, 411–411 (2004).
- [9] Dudareva, N.; Negre, F.; Nagegowda, D. A.; Orlova, I.: Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25(5)**, 417–440 (2006).

- [10] Vlasáková, B.; Gustafsson, M. H. G.: *Clusia blattophila* sp. nov. (Clusiaceae) from an inselberg in French Guiana. *Nordic Journal of Botany* **29**, 178–181 (2011).
- [11] Nagamitsu, T.; Inoue, T.: Cockroach pollination and breeding system of *Uvaria elmeri* (Annonaceae) in a lowland mixed-dipterocarp forest in Sarawak. *American Journal of Botany* **84**, 208–213 (1997).
- [12] Gottsberger, G.: How diverse are *Annonaceae* with regard to pollination? *Botanical Journal of the Linnean Society* **169**, 245–261 (2012).
- [13] Vlasáková, B.; Kalinová, B.; Gustafsson, M. H. G.; Teichert, H.: Cockroaches as Pollinators of *Clusia* aff. *sellowiana* (Clusiaceae) on Inselbergs in French Guiana. *Annals of Botany* **102**, 295–304 (2008).
- [14] pherobase.com: dostupné z URL:
<http://www.pherobase.com/database/compound/compounds-detail-acetoin.php>
 [cit. 28.7.2013]
- [15] Charles D. J.; Simon, J. E.: Comparison of Extraction Methods for the Rapid Determination of Essential Oil Content and Composition of Basil. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **115(3)**, 458–462 (1990).
- [16] Vas, G.; Vékey, K.: Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *International Journal of Mass Spectrometry* **39**, 233–254 (2004).
- [17] Theodoridis, G.; Koster, E. H. M.; de Jong, G. J.: Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *Journal of Chromatography B* **745**, 49–82 (2000).
- [18] Procházková, D.: Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy* **96**, 827–852 (2002).
- [19] Flórez Menéndez, J. C.; Fernández Sánchez, M. L.; Fernández Martínez, E.; Sánchez Uría, J. E.; Sanz-Medel, A.: Static headspace versus head space solid-

- phase microextraction (HS-SPME) for the determination of volatile organochlorine compounds in landfill leachates by gas chromatography. *Talanta* **63**, 809–814 (2004).
- [20] Ashman, T.; Bradburn, M.; Cole, D. H.; Blaney, B. H.; Raguso, R. A.: The scent of a male: the role of floral volatiles in pollination of a gender dimorphic plant. *Ecology* **86**, 2099–2105 (2005).
- [21] Jones, G. R.; Oldham, N. J.: Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* **843**, 199–236 (1999).
- [22] Hayes separation, Inc., dostupné z URL:
<http://www.chromtech.net.au/pdf/Hayesep-1-16.pdf> [cit. 13.5.2013]
- [23] Tankiewicz, M.; Morrison, C.; Biziuk, M.: Application and optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography–flame-ionization detector (GC–FID) to determine products of the petroleum industry in aqueous samples. *Microchemical Journal* **108**, 117–123 (2013).
- [24] Hoskovec, M.; Kalinová, B.; Knížek, M.: Chiral and Nonchiral GC×GC/TOFMS Analysis of Natural Compounds: The Case of Possible Aggregation Pheromones of Chinese Bark Beetles *Ips shangrila* and *Ips nitidus*. In: *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. B. Salih, Ö. Çelikbıçak (Eds.). Rijeka: InTech, 2012, p. 325–346.
- [25] Oldham, J. N.: *Chemical studies on exocrine gland secretions and pheromones of some social insect*. Staffordshire, Kelly University 1994.
- [26] *Techniques in pheromone research*. H. E. Hummel, T. A. Miller (Eds.). New York Springer 1984.
- [27] Adahchour, M.; Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.: Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1186**, 67–108 (2008).

- [28] Jones, G. R.; Oldham, N. J.: Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* **843**, 199–236 (1999).
- [29] Smolková, E.; Feltl, L.; Pacáková, V.: *Plynová chromatografie I. Teoretické základy*. Praha, Univerzita Karlova 1983.
- [30] Tholl, D.; Boland, W.; Hansel, A.; Loreto, F.; Röse, U. S. R.; Schnitzler, J. - P.: Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal* **45**, 540–560 (2006).
- [31] Zenobi, R.; Knochenmuss, R.: Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **17(5)**, 337–366 (1998).
- [32] Kubo, A.; Satoh, T.; Itoh, Y.; Hashimoto, M.; Tamura, J.; Cody, R. B.: Structural Analysis of Triacylglycerols by Using a MALDI-TOF/TOF System with Monoisotopic Precursor Selection. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **24(5)**, 684–689 (2013).
- [33] Douglas, D. J.; Frank, A. J.; Mao, D.: Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **24**, 1–29 (2005).
- [34] de Hoffmann, E.; Stroobant, V.: *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Toronto, John Wiley & Sons, Ltd. 2003.
- [35] Chromedia, dostupné z URL:
<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=theseDsHqnOxmOIIEcCvB&subNav=oibelDsHqnOxmOIIEcCvBG> [cit. 6.7.2013]
- [36] dostupné z URL:
physics.mff.cuni.cz/kevf/skripta/evf075/sims_p8.doc [cit. 6.7.2013]
- [37] Ioanoviciu, D.: The application of ion optics in time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **131**, 43–65 (1994).

- [38] Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A.: The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight massspectrometer with high resolution. *Journal of Experimental and Theoretical Physics* **64**, 82–89 (1973).
- [39] Grundwürmer, J. M.; Bönisch, M.; Kinsel, G. R.; Grotemeyer, J.; Schlag, E. W.: High-resolution mass spectrometry in a linear time-of-flight mass spectrometer. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **131**, 139–148 (1994).
- [40] Poliak, M.; Kochman, M.; Amirav, A: Pulsed flow modulation comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1186**, 189–235 (2008).
- [41] Dimandja, J.-M. D.: Comprehensive 2-D GC provides high-performance separations in terms of selectivity, sensitivity, speed, and structure. *Analytical Chemistry* **76(9)**, 167-174 (2004).
- [42] Kalinová, B.; Jiroš, P.; Žďárek, J.; Wen, X.; Hoskovec, M.: GC × GC/TOF MS technique – A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. *Talanta* **69**, 542–547 (2006).
- [43] LECO, spol. s r.o., dostupné z URL:
http://www.leco.cz/cz/products/sep_sci/pegasus_4d/pegasus_4d.htm
 [cit. 6.5.2013]
- [44] LECO, spol. s r.o., dostupné z URL:
<http://www.leco.com/products/separation-science/gcxcgc-tofms/pegasus-4d-gcxcgc-tofms> [cit. 6.7.2013]
- [45] Cai, J.; Lin P.; Zhu, X.; Su, Q.: Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC–FTIR and GC–MS. *Food chemistry* **99**, 401–407 (2006).
- [46] Oguchi, R.; Shimizu, A.; Yamashita, S.; Yamaguchi, K.; Wylie, P.: Polymer analysis using pyrolysis-GC-FTIR-MS and GC-AED. *Journal of High Resolution Chromatography* **14(6)**, 412–416 (1991).

- [47] Raguso, R. A.; Pellmyr, O.: Dynamic headspace analysis of floral volatiles: a comparison of methods. *Oikos* **81**, 238–254 (1998).
- [48] Volatile Collection Trap, dostupné z URL:
http://www.ars-fla.com/mainpages/volatile%20collection/vct/volatile_vct.html
[cit. 30.7.2013]
- [49] Cheminfo, dostupné z URL:
http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf
[cit. 18.8.2013]
- [50] Degen, T.; Bakalovic, N.; Bergvinson, D.; Turlings, T. C. J.: Differential Performance and Parasitism of Caterpillars on Maize Inbred Lines with Distinctly Different Herbivore-Induced Volatile Emissions. *Plos One* **7(1)**, (1998).
- [51] Hoballah, M. E.; Stuurman, J.; Turlings, T. C. J.; Guerin, P. M.; Connétable, S.; Kuhlmeier, C.: The composition and timing of flower odour emission by wild *Petunia axillaris* coincide with the antennal perception and nocturnal activity of the pollinator *Manduca sexta*. *Planta* **222**, 141–150 (2005).
- [52] Temprado, M.; Chickos, J. S.: Application of correlation-gas chromatography to evaluate the vaporization enthalpy of a component in an equilibrium mixture. *Thermochimica Acta* **435**, 49–56 (2005).
- [53] Dostupné z URL:
<http://www.nbb.cornell.edu/neurobio/ragusolab/Floral%20Scent%20primer.html>
[cit. 20.8.2013]